$Al(OH)_3$ NANOPARTİKÜLÜNÜN VE ETOPOSİDİN KANSER VE SAĞLIKLI İNSAN AKCİĞER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ İN VİTRO SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Rumeysa ODABAŞ HURİYET

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

$Al(OH)_3$ NANOPARTİKÜLÜNÜN VE ETOPOSİDİN KANSER VE SAĞLIKLI İNSAN AKCİĞER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ İN VİTRO SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Rumeysa ODABAŞ HURİYET
0000-0002-3727-1352

Prof. Dr. Özgür VATAN
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2022
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

$Al(OH)_3$ Nanopartikülünün Ve Etoposidin Kanser Ve Sağlıklı İnsan Akciğer Hücreleri Üzerindeki İn Vitro Sitotoksik Ve Genotoksik Etkilerinin Araştırılması

Rumeysa ODABAŞ HURİYET

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özgür VATAN

Bu çalışmada, $Al(OH)_3$ nanopartikülünün tek başına ve kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan kemotöropatik ilaç olan Etoposid ile insan akciğer kanser hücre hattı olan A549 hücreleri ve insan sağlıklı akciğer hücre hattı olan BEAS-2B hücre hattında sitotoksik ve genotoksik etkileri incelemiştir.

$Al(OH)_3$ nanopartikülünün A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında XTT test yöntemi kullanarak hesaplanan IC_{50} değeri sırası ile 9657,179 ± 354,42 µg/mL ve 9758 ± 138,42 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Aynı zamanda bu hücre hatlarında aynı test yöntemi kullanılarak Etoposid'in IC_{75}, IC_{25} ve $IC_{12,5}$ değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan bu konsantrasyonlar ile $Al(OH)_3$ nanopartikülünün IC_{75}, IC_{25} ve $IC_{12,5}$ dozları ile kombin olarak A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırılmıştır.

Etoposid ve $Al(OH)_3$ nanopartikülünün birlikte kullanıldığında Etoposid'in etkinliğini anlamlı olarak arttırdığı XTT test yöntemiyle gösterilmiştir. Etoposid ve $Al(OH)_3$ nanopartikülünün kombin olarak kullanımı tek başına Etoposid'in kullanıldığı duruma göre kanser hücrelerine daha fazla genetik hasar verdiği komet test yöntemiyle gösterilmiştir. Bu genetik hasarın ROS kaynaklı olduğu DFCDA yöntemi ile gösterilmiştir.

Sonuç olarak kemotörapatik bir ilaç olan Etoposid'in sitotoksik ve genotoksik etkinliğinin $Al(OH)_3$ nanopartikülü ile birlikte kullanıldığında anlamlı olarak arttığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Etoposid, Nanopartikül, $Al(OH)_3$, Sitotoksisite Genotoksisite.

2023, x+83 sayfa.

ABSTRACT

Master's Thesis

Investigation of the In Vitro Cytotoxic and Genotoxic Effects of $Al(OH)_3$ Nanoparticles and Etoposide on Healthy and Cancer Epithelial Lung Cell Lines

Rumeysa ODABAŞ HURİYET

Bursa Uludağ University
Institute of Science
Department of Biology

Super visor: Prof. Dr. Özgür VATAN

In this study, the cytotoxic and genotoxic effects of $Al(OH)_3$ nanoparticle alone and in the chemotherapeutic drug Etoposide, which is frequently used in cancer treatment, in human lung cancer cell line A549 cells and human healthy lung cell line BEAS-2B cell line were investigated.

The IC_{50} value of $Al(OH)_3$ nanoparticle calculated using the XTT test method in A549 and BEAS-2B cell lines was calculated as 9657,179 ± 354.42 µg/mL and 9758 ± 138.42 µg/mL, respectively. At the same time, IC_{75}, IC_{25} and $IC_{12.5}$ values of Etoposide were calculated using the same test method in these cell lines. With these calculated concentrations, the cytotoxic and genotoxic effects of $Al(OH)_3$ nanoparticle in combination with IC_{75}, IC_{25} and $IC_{12.5}$ doses were investigated in A549 and BEAS-2B cell lines.

The XTT test method has shown that Etoposide and $Al(OH)_3$ nanoparticles, when used together, significantly increase the effectiveness of Etoposide. The combined use of Etoposide and $Al(OH)_3$ nanoparticle has been shown by the comet test method to cause more genetic damage to cancer cells compared to the use of Etoposide alone. It has been shown by the DFCDA method that this genetic damage is caused by ROS.

As a result, it was observed that the cytotoxic and genotoxic activity of Etoposide, a chemotherapeutic drug, increased significantly when used with $Al(OH)_3$ nanoparticle.

Keywords: Cancer, Etoposide, Nanoparticle, $Al(OH)_3$, Cytotoxicity Genotoxicity.

2023, x+83 pages.

TEŞEKKÜR

Tez konusunda neler çalışabileceğim hakkında bilgi veren, deneylerin nasıl yapılacağını gösteren, takıldığım zaman kapısı hep açık olan, bilgisini ve desteğini esirgemeyen, tez öğrencisi olduğum için kendimi çok şanslı hissettiğim sevgili danışmanım Prof. Dr. Özgür VATAN'a,

Buraya gelinceye kadar eğitim hayatım boyunca elimden tutmuş, benden bilgilerini esirgemeyen, yoluma hep ışık olan, beni bilgileri ile donatmış tüm hocalarıma,

Her konuda yardımıma koşan, deneylerimi yaparken destek veren, sadece tez konusunda değil biyoloji ile alakalı birçok şey öğrendiğim, inancıyla yapabileceğime dair güç veren, bu zorlu yolda elimi hiç bırakmayan sevgili eşim Uzman Biyolog Huzeyfe HURİYET'e,

Deneyler sırasında bilgisini ve desteğini esirgemeyen, yapabileceğime inanan güzel yürekli arkadaşım Zehra BAŞ TEZGELEN'e

Ve buraya kadar gelmemi sağlayan, maddi ve manevi hiç bir desteğini esirgemeyen, ne yaparsam yapayım arkamda duran ve bana hep koşulsuz güvenen, bu zorlu yolda tüm stresime katlanan canım annem Fatma ODABAŞ, canım babam Kadir ODABAŞ'a ve canımın goncası kız kardeşlerim Elyesa ODABAŞ ve Belinay ODABAŞ'a,

Sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ..... viii
ÇİZELGELER DİZİNİ..... x
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK ÖZETLERİ 2
2.1. Kanser Nedir? 2
2.2. Kanser Hücresinin Özellikleri 5
2.2.1. Çoğalma sinyallerini sürdürme 6
2.2.2. Büyüme baskılayıcılarından kaçma 6
2.2.3. Hücre ölüm yolaklarına direnç 7
2.2.4. Tekrarlayan hayatta kalma 7
2.2.5. Damar oluşumunu sağlama (Anjiyogenez) 8
2.2.6. İnvazyon ve metastaz (Hücre göçü) 10
2.3. Kanser Türleri 12
2.3.1. Karsinom 12
2.3.2. Sarkomlar 13
2.3.3. Lösemi 13
2.3.4. Beyin ve omurilik tümörleri 14
2.3.5. Diğer tümör türleri 15
2.4. Akciğer Kanseri 15
2.5.1. Kemoterapi 18
2.5.2. Radyoterapi 20
2.5.4. Cerrahi yöntemler 21
2.6. Nanoteknoloji ve Nanomateryaller 22
2.6.1. Metal nanopartikülleri 24
2.7. Alüminyum Hidroksit ($Al(OH)_3$) Nanopartikülü 25
2.8. Etoposid 26

3. MATERYAL YÖNTEM 28
3.2. Kullanılan Hücre Hatları ve Özellikleri 30
3.3. $Al(OH)_3$ Nanopartikülü ve Etoposid'in Temini 31
3.4. XTT Test Yöntemi 32
3.5. Klonojenik Test Yöntemi 34
3.6. Komet Testi 36
3.7. ROS Testi 40
3.8. İstatistiksel Analiz 41
4. BULGULAR 42
4.1. XTT Bulguları 42
4.1.1. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında $Al(OH)_3$ nanopartikülü için elde edilen XTT sonuçları 42
4.1.2. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında Etoposid için elde edilen XTT sonuçları 45
4.1.3. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında $Al(OH)_3$ nanopartikülü ve Etoposid'in kombin konsantrasyonları için elde edilen XTT sonuçları 47
4.2. Klonojenik Test Bulguları 50
4.2.1. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında $Al(OH)_3$ nanopartikülü için elde edilen klonojenik testi sonuçları 50
4.2.2. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında $Al(OH)_3$ nanopartikülü ve Etoposid'in kombin dozları için elde edilen klonojenik test sonuçları 52
4.4. Komet Testi Bulguları 56
4.4.1. Kuyruk Uzunluğu Bulguları 56
4.4.2. Kuyruk % DNA bulguları 59
4.4.3. Kuyruk OTM bulguları 62
4.5. ROS Testi Bulguları 65
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 68
KAYNAKLAR 76
ÖZGEÇMİŞ 83

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
µg	Mikrogram
^0C	Celcius
A549	Akciğer Kanseri Epitelyum Hücre Hattı
Beas-2B	Akciğer Sağlıklı Epitelyum Hücre Hattı
CO_2	karbondioksit
dH_2O	Distile su
dk	Dakika
gr	Gram
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HELA	İnsan Serviks Adeno Karsinoma Hücre Hattı
kg	kilogram
L	Litre
mA	miliAmper
MCF7	İnsan Meme Adenokarsinoma Hücre Hattı
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
Na_2EDTA	Sodyum Etilendiamin Tetra Asetik Asit
NaOH	Sodyum Hidroksit
nM	Nanomolar
V	Volt
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
Al	Alüminyum
Cu	Bakır
TiO_2	Titanyum Di Oksit
Zn	Çinko
Ag	Gümüş
Al(OH)	Alüminyum hidroksit
nm	Nanometre

Kısaltmalar	Açıklama
BSA	Bovine Serum Albumin
DCFDA	2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate
DCFH	Dichlorodihydrofluorescin
DMSO	Dimetil Sülfoksid
DNA	Deoksiribonukleik Asit
EtBr	Etidyum bromür
FBS	Fetal Bovine Serum
FISH	Floresan in situ hibridizasyon
LMA	Low Melting Agoroz (Düşük sıcaklıkta eriyen agaroz)
MTT3	(4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2-5-difeniltetrazolyum bromür
NP	Nanopartikül
PBS	Fosfat Buffer Serum
RBC	Red Blood Cell (Kırmızı kan Hücreleri)
RNA	Ribonukleik asit
ROS	Serbest Reaktif Oksijen
KLL	Kronik Lenfoid Lösemi

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1.	Kanser hücrelerinin özellikleri…….	5
Şekil 2.2.	Anjiyogenez oluşum mekanizması A) Anjiyogenetik faktörlerin salgılanması B) Damar filizlenmesi C) Tümör için yeni damar ağı oluşumu……	9
Şekil 2.3.	İnvazyon ve metastaz oluşum mekanizması…….....	11
Şekil 2.4.	Nanopartikül boyut karşılaştırması…….....	22
Şekil 2.5.	Nanopartiküllerin hücreler üzerindeki etki mekanizmaları…….	23
Şekil 2.6.	İnsan vücuduna nanopartiküllerin giriş şekilleri ve etkilenen doku ve organlarda ortaya çıkabilecek bazı hastalıklar…….	23
Şekil 2.7.	Alüminyum Hidroksit ($Al(OH)_3$) Nanopartikülü…….	25
Şekil 2.8.	Etoposid'in moleküler yapısı…….....	26
Şekil 2.9.	*Podophyllum peltatum* (Yabani adamotu)……...	27
Şekil 3.1.	XTT, canlı hücrelerde metobolizasyonu sonucunda besiyerinde çözünebilen formozan kristallerine dönüşmektedir…….	32
Şekil 4.1.	A549 hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikülü ile 24 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen yüzde canlılık değeri…….	42
Şekil 4.2.	BEAS 2B hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikülü ile 24 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri…….	43
Şekil 4.3.	A549 hücre hattında Etoposid ile 24 saat muamelesi sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri…….	45
Şekil 4.4.	BEAS-2B hücre hattında Etoposid ile 24 saat muamelesi sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri…….	46
Şekil 4.5.	A549 hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin konsantrasyonları ile 24 saat muamelesi sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri……	47
Şekil 4.6.	BEAS 2B hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri……	48
Şekil 4.7.	A549 hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikülü ile 24 saat muamelesi sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri……...	50
Şekil 4.8.	A549 hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikülü ile 24 saat muamelesi sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri……	51
Şekil 4.9.	A549 hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri……..	53
Şekil 4.10.	BEAS-2B hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri……	54
Şekil 4.11.	A549 hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri……..	56
Şekil 4.12.	BEAS-2B hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri……...	57

Şekil 4.13. A549 hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen kuyruk % DNA değerleri……. 59

Şekil 4.14. BEAS-2B hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen kuyruk % DNA değerleri……. 60

Şekil 4.15. A549 hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen kuyruk OTM değerleri……. 62

Şekil 4.16. BEAS-2B hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen kuyruk OTM değerleri……. 63

Şekil 4.17. A549 hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 4 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen kuyruk ROS değerleri……... 65

Şekil 4.18. BEAS-2B hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikülü ve Etoposid'in kombin dozları ile 4 saat süre muamelesi sonucunda elde edilen kuyruk ROS değerleri…….. 66

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1.	Çalışmalarda kullanılan ekipmanlar……..	28
Çizelge 3.2.	Çalışmada kullanılan sarf malzemeler……..	29
Çizelge 3.3.	$Al(OH)_3$ Nanopartikülünün şirket tarafından ölçülmüş özellikleri….	31
Çizelge 3.4.	Etoposid'in ticari formunun içerisinde bulunan diğer maddeler ve konsantrasyonları……..	31
Çizelge 4.1.	$Al(OH)_3$ nanopartikülünün A549 ve BEAS 2B hücre hatlarında 24 saat sonunda elde edilen yüzde canlılık değerleri……..	44
Çizelge 4.2.	Etoposid'in A549 ve BEAS 2B hücre hatlarında 24 saat sonunda elde edilen yüzde canlılık değerleri……	46
Çizelge 4.3.	A549 ve BEAS 2B hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat muamelesi sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri……..	49
Çizelge 4.4.	$Al(OH)_3$ nanopartikülünün A549 ve BEAS 2B hücre hatlarında 24 saat sonunda elde edilen yüzde canlılık değerleri……..	52
Çizelge 4.5.	A549 ve BEAS 2B hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat muamelesi sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri……..	55
Çizelge 4.6.	A549 ve BEAS 2B hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat muamelesi sonucunda elde edilen kuyruk uzunluk değerleri…….	58
Çizelge 4.7.	A549 ve BEAS-2B hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat muamelesi sonucunda elde edilen kuyruk % DNA değerleri…….	61
Çizelge 4.8.	A549 ve BEAS-2B hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat muamelesi sonucunda elde edilen kuyruk OTM değerleri……	64
Çizelge 4.9.	A549 ve BEAS-2B hücre hattında Al(OH)3 nanopartikülü ve Etoposid'in kombin dozları ile 4 saat muamelesi sonucunda elde edilen ROS değerleri……..	67

1. GİRİŞ

Kanser, çağımızda kardiyovasküler hastalıklardan sonra en çok ölüme neden olan ikinci hastalıktır (WHO,2008). Kanser tedavisinde sıklıkla cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi kullanılır.

Kanser tedavisinde kullanılmak üzere alternatif tedaviler geliştirilmektedir. Bu tedaviler arasında hormon tedavileri, yanı sıra biyolojik tedavi yöntemleri ve hedefe yönelik tedaviler kullanılabilmektedir.

Nanopartiküller, günümüzde çok farklı alanlarda kullanımı olan yapılardır. Özellikle çeşitli metal nanopartiküllerin antikanser potansiyellerini gösteren çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır.

Nanopartiküllerin antikanser aktivitelerinin belirlendiği çalışmalara benzer şekilde, nanotoksisite ve nanogenotoksisite konuları kapsamında değerlendirilebilinecek olan tez çalışmasımızda $Al(OH)_3$ nanopartikülünün (AlNp) tek başına, insan akciğer kanser (A549) ve sağlıklı insan akciğer hücreleri (BEAS-2B) üzerindeki *in vitro* sitotoksik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi ve AlNp'nin akciğer kanserlerinin tedavisinde de kullanılan bir kemoterapötik olan etoposid ile birlikte uygulanması ile insan akciğer kanser (A549) ve sağlıklı insan akciğer hücreleri (BEAS-2B) üzerindeki *in vitro* sitotoksik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Kanser Nedir?

Kanser, bazı vücut hücrelerin kontrolsüz olarak bölünmesi sonucu oluşan farklılaşmamış hücrelerin invazyon ve metastaz aracılığıyla doku ve organların işlevlerini ve bu hücrelerin vücudun diğer bölgelerine doğru yayıldığı, ölüm oranı yüksek olan bir hastalıktır (Weinberg, 2014).

Vücudumuzda bulunan organlar hücrelerden oluşur. Hücreler vücudumuzun yapısal ve işlevsel en küçük birimidir. Çoğu sağlıklı vücut hücresi bölünme yeteneğine sahiptir. Gerek büyüme ve gelişme aşamalarında gerekse yıpranan ve yaşlanan hücrelerin yerine yenilerinin oloşturulması, amacıyla hücreler bölünürler. Fakat hücreler sonsuza kadar bölünmez. Bölünmeleri kontrol mekanizmaları sayesinde sınırlıdır. Her hücrenin bir bölünme sınırı vardır ve sağlıklı hücreler ne kadar bölünmesi gerektiğinin kontrolünü sağlayabilir. Fakat kanser hücreleri, bu kontrolü kaybeder ve kontrolsüzce bölünür. Bölünen kanser hücreleri birikerek tümörleri oluştururlar (Weinberg, 2014).

Kanser, ortalama yüz trilyon hücreden oluşan yetişkin bir insan vücudunun herhangi bir dokuda başlayabilir. Normalde sağlıklı hücreler, vücutta ihtiyaç duyulan yeni hücreler oluşturabilmek için hücre proliferasyonu adı verilen süreçle büyür ve çoğalırlar (Weinberg, 2014).

Bazı durumlarda bu düzenli işeleyen süreç bozulur ve anormal veya hasar almış hücreler bölünmemeleri gerekirken bölünerek çoğalırlar. Bu hücreler, doku yığınları olan tümörleri oluşturabilir. Oluşan tümörler; iyi huylu (selim/benign) veya kötü huylu (habis, malign) olabilirler (Baran, 2018).

Maling tümörler çevredeki dokulara yayılma (metastaz) gösterir veya onları istila eder (invazyon). Metastaz adı verilen bir süreç ile farklı doku ve organlara yayılarak yeni tümörler oluşturabilirler. Birçok kanser katı (solid) kitlesel tümörler oluşturur, fakat lösemi gibi kan kanserleri genellikle kitlesel tümörler oluşturmaz (Baran, 2018).

Bening tümörler çevrelerindeki dokulara çoğu zaman metastaz göstermez ve onları istila etmez. Fakat kanserli tümörler cerrahi yöntemlerle uzaklaştırılmasına rağmen tekrardan ortaya çıkablirler. Ancak iyi huylu (bening) tümörler de bazen oldukça büyük olabilir. Bazı durumlarda özellikle beyin ve sinir dokusunda iyi huylu (bening) tümörler, ciddi rahatsızlıklara neden olabilir veya yaşamı ciddi manada tehdit edebilir (Baran,2018).

Kanser farklı doku ve hücre seviyesinde ortaya çıkan bir hastalıktır. Bu hücresel ve dokusal çeşitlilik, spesifik teşhis ve kanser tedavinde büyük bir zorlukların oluşmasına neden olur (Meacham ve Morrison, 2013; Fisher ve ark., 2013).

Erkeklerde görülen kanser türleri ilk başta prostat, ikinci olarak akciğer daha sonra sırasıyla bronş, kolon, rektum ve mesanedir. Kadınlarda ise sırasıyla meme dokusu, akciğer ve bronş, kalın bağırsak, rahim ağzı ve tiroit bezi en yüksek prevalansa sahiptir.

Erkeklerde prostat ve kadınlarda meme kanserinin kanser prevalansının büyük bir kısmını oluşturduğu görülmektedir (Siegel ve ark., 2016).

Çocuk yaş grubuna bakıldığında ise en yüksek prevalansa sahip kanser türleri kan kanseri, beyin ve lenf sistemi ile ilgili kanserlerdir (Schottenfeld ve ark., 2006; Yoo ve Shin, 2003).

Kanser, genlerde art arda meydana gelen gelen mutasyonlar sonucunda oluşur ve oluşan bu mutasyonlar hücre içerisinde birçok fonksiyonun değişmesine neden olur. Kimyasal mutajenler, genler üzerinde mutasyonlara ve kanser hücrelerinin oluşmasında çok açık bir role sahiptir (Aizawa ve ark., 2016).

Kanserojen özelliklere sahip kimyasal maddeler, hücrelerin sitoplazmasında veya çekirdeğinde doğrudan veya dolaylı olarak etkileri gösterebilmektedir. Bu kanserojen bileşikler epigenetik bozukluklara ve genlerde mutasyonlara yol açmaktadır (Poon ve ark., 2014; Trafialek ve Kolanowski, 2014; Cumberbatch ve ark., 2015; Antwi ve ark., 2015).

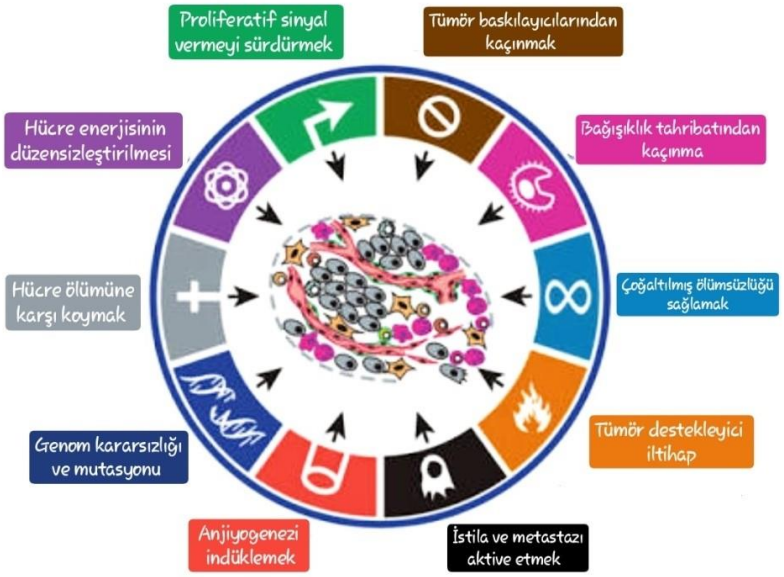
Kanserin oluşmasında, bakteriler ve virüsler gibi yapıların yanı sıra radyasyon ışınları, teşhis edilmiş kanserlerin yaklaşık %7'sini oluşturan diğer karsinogenez faktörleri olarak bilinir (Parkin, 2006). Genel olarak kanser, hücreler arası iletişimi bozar ve hücre canlılığı için hayati öneme sahip genlerin işlevsiz kalmasına neden olur. Hücrede oluşmuş bu bozukluklar hücre döngüsünün kontrolünün kaybedilmesinde etkilidir ve anormal proliferasyona yol açar (Seto ve ark., 2010; Cigudosa ve ark., 1999). Proto-onkogenler, sağlıklı hücrelerde hücre bölünmesi ve büyümesi ilişkili ve sorumludur ancak protoonkogenler mutasyona uğraması sonucu onkogenlere dönüşerek hücre döngüsünün kontrolden çıkmasına neden olurlar (Shtivelman ve ark.,1985).

Bu duruma ilave olarak tümör baskılayıcı (tümör suprasör) genlerin eksikliği de (mutasyona uğraması), kontrolsüz hücre bölünmelerine yol açar (Matlashewskive ark., 1984).

Kanserler mikroskop altında görünüşlerine ve oluşmaya başladıkları organa göre sınıflandırılırlar. Çeşitli kanserlerin tedavisinde, kanser hücrelerindeki büyüme ve yayılma farklılıkları nedeniyle değişik yaklaşımlar uygulanmaktadır. (Schirrmacher, 2019; Anonim, 2018).

2.2. Kanser Hücresinin Özellikleri

Kanser hücrelerinin ayırt edici özellikleri arasında çok aşamalı gelişim sürecinde kanserleşmeye başlayan hücrelerinin kazandığı sekiz biyolojik özelliği içerir. Bu özellikler, kanser hastalığın karmaşıklığını daha açık bir şekilde gösterebilmek için düzenleyici bir ilke oluşturur. Bunlar hücre bölünmesini uyaran sinyallemeyi sürdürmek, büyüme baskılayıcılardan kaçınmak, hücre ölümüne direnmek, DNA replikasyonunu devamlı sağlamak, anjiyogenezi indüklemek, istila ve metastazı (çevre dokulara yerleşme) hızlandırmak, enerji metabolizmasını (ATP üretimi) yeniden düzenlemek ve bağışıklık sisteminden kaçınmak yer alır (Şekil 2.1) (Hanahan ve Weinberg, 2011).



Şekil 2.1. Kanser hücrelerinin özellikleri (Hanahan ve Weinberg, 2011)

Ayırt edici özelliği sağlayan genlerin mutasyonel olarak değiştirilmesini sağlayan genom kararsızlığı ve birden çok ayırt edici işlevin edinilmesini teşvik eden bağışıklık iltihabı bu ayırt edici özelliklerin ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Kanser hücrelerine ek olarak, kanser hücre toplulukları daha farklı ve karmaşıklık boyutta davranışlar sergilerler: Bunlar, tümör mikro çevresini oluşturan ve tümör için ayırt edici özelliklerin oluşmasına katkı sağlayan görünüşte normal sağlıklı hücrelerden oluşan bir yapıdır. Bu kavramların daha yaygın olarak araştırılması kanseri daha iyi tanımamıza ve kanser tedavisi için yeni araçların geliştirilmesine giderek daha fazla katkı sağlayacaktır.

2.2.1. Çoğalma sinyallerini sürdürme

Kanser hücrelerinin proliferasyonu tetikleyici sinayalleri oluşturması en temel özelliklerindendir. Sağlıklı hücreler çevresindeki hücrelerin bölünmesini uyaran sinyalleri kontrollü olarak hücre dışına salgılarlar. Fakat maling kanser hücreleri bu sinyal moleküllerini salınımını kontrollünü kaybetmişlerdir. Sağlıklı hücreler büyümek ve bölünmek için gerekli olan sinyalleri hücre dışından almak zorundadırlar. Fakat maling hücreler kendihücre bölünmesini teşvik edecek sinyalleri kendisi üretip kendi bölünmelerinin teşvik edebilir. Bu sinyaller genellikle hücre içinde tirozin kinaz bölgelerini ihtiva eden hücrenin yüzey reseptörlerine bağlanabilme yetneği olan büyüme faktörleri tarafından sağlanır. Kanser hücreleri birden fazla farklı yolak aracılığı ile büyüme sinyallerini üretmeye devam ettirebilirler: kendi kendini uyarabilen proliferasyona yol açan kognat reseptörleri aracılığı ile algılanabilen büyüme faktörü (growth factor) ligandlarını kendileri salgılayabilirler. Sağlıklı hücreler tümör çevresinde kanser hücrelerinin büyüme faktörü salgılaması için sinyal gönderebilirler. Bunun yanında bölünme sinyallerinin kontrollü, hücre yüzey reseptör proteinlerinin translasyonun artması ilede bozulabilir (Hanahan ve Weinberg, 2011).

2.2.2. Büyüme baskılayıcılarından kaçma

Kanser hücreleri proliferatif sinyallerin devamlılığını sağlamalarına ek olarak, bu hücreler proliferasyonunu olumsuz yönde etkileyecek yolaklardan da kurtulabilme potansiyaline sahiptir. Bu yeteneklerinin (olumsuz sinyallerden kaça bilme mekanizmaları) oluşmasında p53, RB1 gibi tümör suprasör proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonlarının etkinliklerine bağlıdır. Bu genler hücrenin büyüme gelişme ve yaşlanmasında ve programlı hücre ölümü olan apoptoza neden olabilir veya tam tersi olarak hücre proliferasyonunda başrol oynamakta ve hücrenin geleceğini belirlemektedirler. Retinoblastoma proteini büyük bir kısmı hücre dışından kaynaklanan tehlike moleküllerini aktarırken p53 geni hücre içinden kaynaklı olan metabolik yolakların sağlıklı işlev görmemesi durumunda hücre içi stres sensörlerinden sinyal alır ve hücre döngüsünün durdurulmasını sağlar. Eğer hücre DNA'sında hasar oluşmuş ise DNA tamir genlerinin aktivitesinin artmasına ve programlı hücre ölümünü uyarma gibi önemli olayların başlamasını tetikler (Curto ve ark., 2007; Partanen ve ark., 2009).

2.2.3. Hücre ölüm yolaklarına direnç

Hücre ölümü, organ ve dokuların sağlıklı yapısının korunması ve dokuların yapısal bütünlüğünün korunması için olumlu veya olumsuz durumlarda genlerin kontrolünde programlanmış bir mekanizmadır. Apoptoz olarak isimlendirilen bu olay, hücre içinden veya hücre dışından tetiklenebilir. Apoptoz, DNA hasarı gibi hücre için hayati öneme sahip durumlarda ve bozulmuş kalıtsal bilginin gelecek nesillere aktarılmaması için gereklidir (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Kanser hücrelerinin hayatlarına devam edebilmesi ve gelişimlerinin sürdürebilmesi için programlı hücre ölümü mekanizmalarını atlatabilmesi gerekmektedir. Kanser hücreleri apoptozdan kaçabilmek için birçok farklı metabolik yolak kullanmaktadır. Kanser hücrelerinin metabolizmalarını değiştirerek kullandığı bu farklı mekanizmalar dikkate alındığında ve bu mekanizmaları hedefleyerek kanser hücrelerinin apoptoza karşı oluşturduğu direnci değiştirebilecek ajanların geliştirilmesinin kanser tedavileri için önemli bir yeri olduğu düşünülmektedir.

Hücre ölümünde sadece apoptoz mekanizması yoktur hücre ölümü çok farklı yolaklarlada teşvik edilebilir. Özellikle en çok araştırılan Otofaji ve nekroz gibi mekanizmalar da hücrelerin hayatta kalmasıyla ilişkilidir. Otofaji hücrelerin ölümünde apoptoz gibi önemli rol almasına karşın apoptoz ile otofaji birbirlerinden morfoloji ve moleküler özellikler açısından birbirleri ile çok farklılık göstermektedir (Hanahan ve Weinberg, 2011; Arslan ve ark., 2011).

2.2.4. Tekrarlayan hayatta kalma

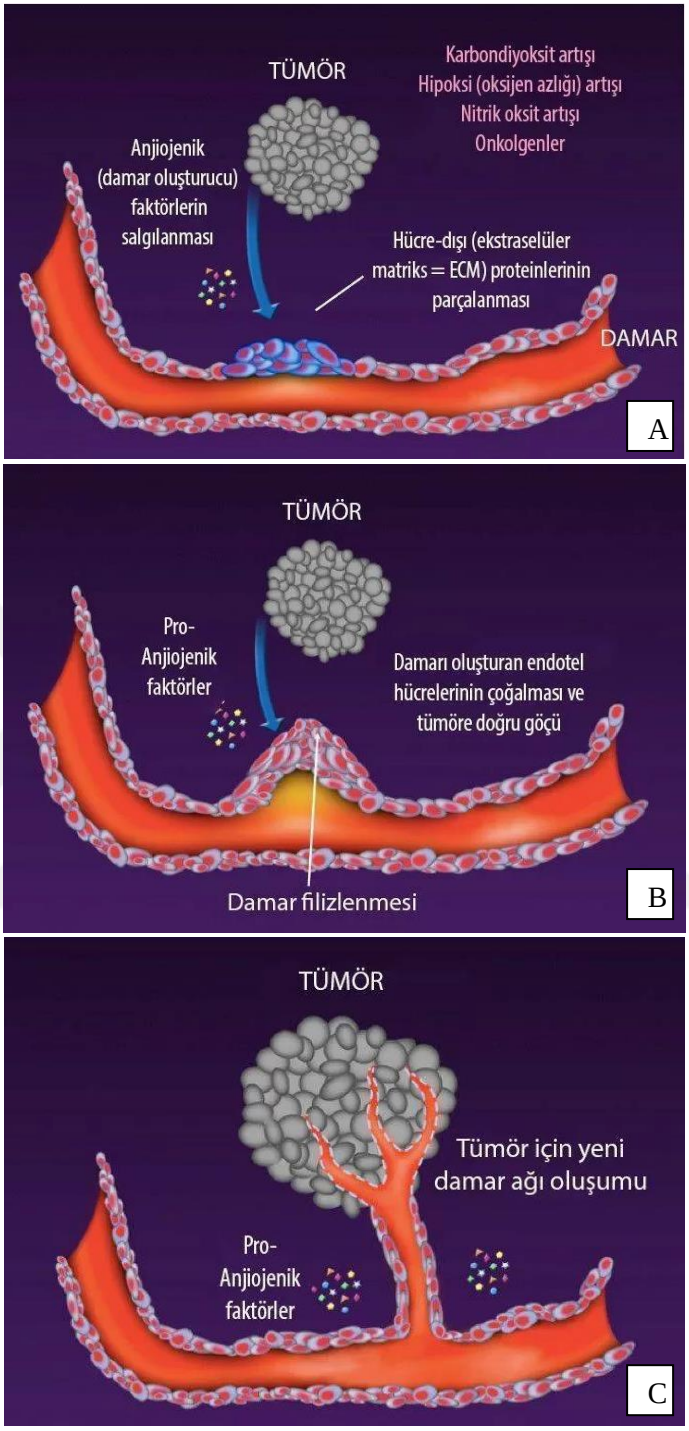
Sağlıklı hücrelerde hayat döngülerinde dokuların ihtiyaçlarına göre büyümesi ve bölünmesi, sonunda da hücrelerin yaşlanarak yaşamlarına son vermesi söz konusudur. Hücreler yaşam döngülerinin sonunda bölünme yeteneklerini kaybederler. Fakat bulundukları doku ve organların sağlıklı bir şekilde fonksiyonlarını yerine getirebilmek için yaşamlarına devam ederler.

Hücrelerin kromozomlarının uç kısımlarında bulunan çoklu tekrarlayan heksanükleotid dizileri olarak bilinen telomerler bulunur. Telomerler her hücre siklusu sonununda kısalır. Telomerlerin kısalması, hücrelerin DNA'larının işlevsel gen bölgelerinin sonraki bölünmelerde mutasyona uğramalarını engellemektedir. Telomerik DNA'ların uzunluğuna bakılarak, hücrelerin daha kaç bölünme yapabilecekleri söylenebilir. Hücrelerde telomer bölgelerin kısalması sonucu sınırsız bölünme potansiyeline sahip olan hücrelerde telomeraz adı verilen enzim DNA polimeraz gibi davranarak telomer bölgelerinin uçlarına tandem dizileri ekler ve telomerin kısalmasını önler. İnsan maling tümör hücreleri gibi sınırsız bir şekilde bölünme yeteneğine sahip hücrelerin yaklaşık %90'ında bu enzim ifade edilmektedir (Kawai ve ark., 2007).

2.2.5. Damar oluşumunu sağlama (Anjiyogenez)

Tüm hücreler hayat döngülerini devam ettirebilmek için besin ve oksijene ihtiyaç duymaktadır. Bulundukları organ ve dokularda işlevlerini yerine getirmek için bu temel maddelerin almak ve bu maddelerin kullanılması sonucu ortaya çıkan metabolik atıkları uzaklaştırmak zorundadırlar. Besinlere ve oksijene ulaşmak için veya diğer faktörleri almak ve oluşan metabolik atıkların dokudan uzaklaştırılması için bulundukları organlara içerisinde damar oluşumunu sağlamak zorundadırlar. Ayrıca kanser hücreleride metabolik atıkların dokudan uzaklaştırılması gibi ana ihtiyaçların giderebilmek için damar oluşumunu uyarırlar. Anjiyonegenez adı verilen bu olayla tümör ilişkili damara neovaskülatör damar olarak isimlendirilir (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Neovaskülatör, kanser hücrelerinin besin ve oksijen ihtiyacını karşılamaktan sorumludur. Embriyogenez sırasında da damar sistemini oluşturur ve gelişimini sağlar. Budurum endotel hücrelerinin oluşumunu sağlayarak daha önce oluşmuş damarlardan yeni damarların oluşumunu ve bu damarlar ile birleşmesini sağlar. Bu farklılaşmaların ardından normal damar oluşumu büyük ölçüde durur. Fakat yetişkinlik döneminde yara dokusunun onarılması için metobolik süreçlerle damar oluşumu tekrardan sağlanır. Geçici süre ile başlayan bu metabolik yolla damar oluşumu sağlıklı dokularda ihtiyaç durumunda oluşmasına rağmen tümörlerin gelişimi sırasında aktiftir (Şekil 2.2) (Hanahan ve Weinberg, 2011; Ellis ve Hicklin, 2008).



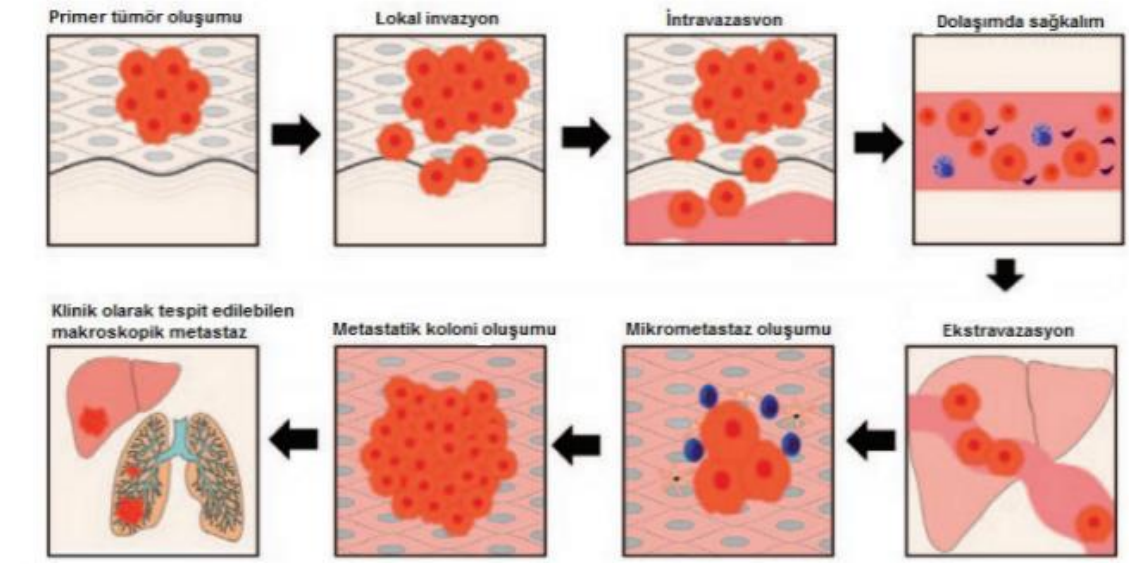
Şekil 2.2. Anjiyogenez oluşum mekanizması **A)** Anjiyogenetik faktörlerin salgılanması **B)** Damar filizlenmesi **C)** Tümör için yeni damar ağı oluşumu (Anonim, 04.01.2023).

2.2.6. İnvazyon ve metastaz (Hücre göçü)

Histolojik kesitler sayesinde kanser hücrelerinin takip edilmesi ve karakterizasyonun yapılabilmesi mümkün olmuştur. Maling tümörlerin ve kanser hücrelerinin bulundukları doku ve organlarda diğer hücrelerle yaptıkları etkileşimler, hücre dışı matriks ile bağlanma durumları ve morfolojilerindeki oluşan farklılıklar göz önünde bulundurulduğunda kanserin invazyon ve metastaz yapabilme yeteneği olduğu göstermektedir (Pavese ve ark., 2010; Wittekind ve Neid, 2005).

Kanser hücrelerinin bulundukları dokuyu terk edip çevre dokuyu işgal etmesi ya da kan ve lenf damar ağı ile farklı doku ve organlara göç ederek gittiği dokularda kontrolsüz bir şekilde bölünmelerini sürdürmeleri metastaz olarak isimlendirilir. İyi huylu tümör hücreleri, bulundukları dokularda bölünür ve bulundukları organ ölmediği sürece o dokuda beklerler. Bu tür yapılar kanser olarak isimledirilmezler. Ancak kötü huylu tümörler, bulundukları dokulardada temel membranlardan geçerek daha alt dokulara sızabilirler ve damar oluşumunu, invazyon ve metastazı sağlayabilirler (Pavese ve ark., 2010; Wittekind ve Neid, 2005).

Bu özelliğe sahip tümörler, invazyon ve metastaz özelliğine de sahip olduğundan diğer özelliklerle birlikte kanser olarak isimlendirilmektedir. Hücrelerin birbirleri ile ve hücre dışı matriks ile olan etkileşimlerinin yani kontak inhibisyonunun kopmasıyla sonuçlanan bu durum potansiyel bir hastalık halini almaktadır (Şekil 2.3) (Pavese ve ark., 2010; Wittekind ve Neid, 2005).



Şekil 2.3. İnvazyon ve metastaz oluşum mekanizması (Pacmayr ve ark., 2017).

2.3. Kanser Türleri

Kanserin oluşum mekanizması ve kanserin oluştuğu dokulara bağlı olarak birçok kanser türü olduğu bilinmektedir. Kanserler oluştuğu organ ve dokulara göre isimlendirilmektedir. Kanserler, epitel hücresi veya skuamöz (normal dokularda doku yüzeylerinde bulunan hücrelerdir, ayrıca skuamoz hücreler dokuları enfeksiyon ve yaralanmalardan koruyan bir örtü oluştururlar) hücre gibi hücre tipine göre de isimlendirilebilirler (Baran, 2018).

2.3.1. Karsinom

Prevalansı en yüksek kanser türüdür. Vücudumuzu saran epitel hücreler tarafından oluşturulmaktadır. Mikroskop ile incelendiğinde genellikle dikdörtgen benzeri bir forma sahip olan birçok farklı epitel hücresi türü vardır. Farklı epitel hücre tiplerinde oluşan tümörler farklı özel isimlerle adlandırılır. Bunlar: Adenokarsinom türü kanserler, salgı veya mukus üreten epitel hücrelerinde oluşan bir kanserlerdir. Bu tip epitelial hücre içeren dokular glandüler dokular olarak isimlendirilir. Meme, kolon ve prostat kanserlerinin çoğu adenokarsinom türü kanserlerdir (Baran, 2018).

Bazal hücreli karsinomlar derinin dış tabakası yani epidermis olarak isimlendirilen alt veya bazal tabakasında oluşmaya başlayan kanserdir (Baran, 2018).

Skuamöz karsinomlar, derideki epitel dokunun hemen alt kısmında yer alan epitel hücrelerinde meydana gelen oluşan bir kanserdir. Skuamöz hücreler böbrekler, bağırsaklar, mesane akciğerler ve mide gibi diğer birçok organda bulunurlar. Skuamöz hücreler, mikroskop altında incelendiğinde düz bir formda görünürler. Skuamöz hücreli karsinomlar epidermoid karsinomlar olarak da adlandırılır (Baran, 2018).

Transisyonel hücreli karsinom, transisyonel epitel hücreleri veya ürotelyum olarak isimlendirilen bir tür epitel dokusunda meydana gelen bir kanserdir. Şekillerini değiştirebilen epitel hücre katmanlarından oluşan bu doku, idrar kesesinin, üreterlerin ve böbreklerde (renal pelvis) ve diğer birkaç organın iç yüzeyinde bulunur. Bazı idrar kesesi kanserleri, üreter ve böbrek kanserleri transisyonel hücreli karsinomlardır (Baran, 2018).

2.3.2. Sarkomlar

Sarkomalar, kas dokusu, yağ dokusu, kan damarları, lenf damarları, fibröz doku (tendonlar ve bağlar gibi) gibi dokularda meydana gelen kanser türüdür. Ayrıca bu kanser türü kemik ve yumuşak dokularda da oluşabilmektedir. Osteosarkom en fazla teşhisi konulan kemik kanseri türüdür (Baran, 2018).

Yumuşak doku sarkomlarının en sık görülentürleri leiomyosarkom(düz kas tümörü), herpes virüsü kaynaklı olan bir damar tümörü olan kaposi sarkomudur (Baran, 2018; Anonim, 08.10.2021).

2.3.3. Lösemi

Kanın oluşmasını sağlayan kemik dokunun içerisinde bulunan ilik hücrelerinde başlayan kanserlere lösemi adı verilir (Tebbi, 2021).

Solid tümörler oluşturmayan lösemilerde, dolaşımdaki kan ve kemik iliğinde fazla sayıda normal olmayan akyuvar kan hücresi (lösemik patlama hücreleri) birikerek normal kan hücrelerini işlevsiz bırakırlar. Normal kan hücrelerinin seviyesinin düşmesi, vücut dokularının oksijen almasını, pıhtılaşmayı kontrol etmesini veya virüs ve bakterilere karşı direncinin zorlaştırabilir (Anonim, 08.10.2021).

Hastalığın kanserin oluşmaya başladığı kan hücrelerinin tipine (lenfoblastik veya miyeloid) göre gruplandırılır. Akut lösemi türleri hızlı büyür fakat kronik lösemi formları daha yavaş seyir gösterir (Thomas, 2021).

Lenfomalar, kanda bulunan T veya B lenfosit hücreleri oluşan kanserdir. Bu hücreler bağışıklık sisteminideki savaşçı hücreleridir. Lenf düğümlerinde, kılcallarında ve damarlarında ve ayrıca vücudun diğer kısımlarında normal olmayan beyaz kan hücreleri görülür (Thomas, 2021).

Multipl miyelom kanserleri, farklı bir bağışıklık hücresi olan plazma hücrelerinde ortaya çıkan kanserlerdir.

Miyelom hücreleri olarak isimlendirilen plazma hücreleri, kemik iliğinde birikirler ve vücuttaki kemiklerde tümör oluşumlarına neden olurlar. Multipl miyelom kanserleri, plazma hücreli miyelom ve Kahler hastalığı olarak da isimlendirilir (Anonim, 08.10.2021).

Melanomlar, melanin (cilde rengini veren pigment) üreten hücreler olan melanositlerde meydana gelen kanser türüdür. Melanomların çoğu ciltte yüzeyinde oluşur, fakat melanomlar göz gibi diğer pigment içeren organ ve dokularda da oluşabilir (Anonim, 08.10.2021).

Olgun forma sahip lenfositlerin kemik iliğinde aşırı üretilmesi sonucu ortaya çıkar. Bu normal olmayan hücreler olgunlaşmış normal lenfositler gibi görülmektedir. Fakat normal lenfositler gibi vücudumuzda bakteri virüs gibi enfeksiyonlara karşı savaşamazlar.

Kronik lenfoid lösemilerde kanser hücreleri kemik iliğinde, kan damarlarında ve lenf sisteminde bulunurlar ve lenf düğümlerinde şişkinlikler meydana gelir. Kronik lenfoid lösemiler gözlemlenen lösemilerin %30'unu oluşturmaktadır. Kronik lenfoid lösemiler 30 yaşın altında çok az miktarda görülürler, ancak prevalansı yaşın artması ile artmaktadır. Kronik lenfoid lösemiler en çok olarak 60-70 yaş arasında gözlenmektedir (Manisha, 2012).

2.3.4. Beyin ve omurilik tümörleri

Sinir sistemini oluşturan beyin ve omurilikte oluşan tümörler birçok farklı türü bulunur. Bu tümörler, meydana geldikleri hücrenin tipine ve tümörün merkezi sinir sisteminde hangi organda oluştuğuna göre adlandırılır. Örneğin, astrositik tümörler, nöronların sağlıklı yapısının korunmasına yardımcı olan astrosit hücrelerinde oluşmaya başlarlar. Beyin tümörleri iyi huylu (bening) veya kötü huylu (maling) olabilir (Eslaminejad ve ark. 2022).

2.3.5. Diğer tümör türleri

Germ hücreli tümörler, gamet hücreleri olan sperm veya yumurtaların oluşmasını sağlayan dokularda meydana gelen tümör türüdür. Bu tümörler üreme sisteminin her yerinde oluşabilir bu tümörler iyi huylu veya kötü huylu olarak meydana gelebilir (Anonim, 11.10.2021).

Nöroendokrin tümörler, sinir sisteminden gelen bir uyarılara cevap olarak hormonları kana salınımında görevli olan bezlerde meydana gelen tümörlerdir. Sağlıklı hücrelere sahip bezlere göre daha fazla hormon üreterek saglayabilme yeteneğine sahip bu tümörler çok farklı hastalıklara da neden olabilir. Nöroendokrin tümörlerin iyi huylu veya kötü huylu türleri bulunabilir (Anonim, 11.10.2021).

Karsinoid tümörler, nöroendokrin tip tümörlere örnek verilebilir. Genel olarak sindirim sisteminde (genellikle rektum ve ince bağırsakta) bulunan, yavaş gelişim gözlenen tümörlerdir. Karsinoid tümörler karaciğere veya vücudun diğer dokularına metastaz yapabilirler. Serotonin gibi nörotransmitterler veya prostaglandinler gibi maddeler salgılayarak karsinoid sendromalar ortaya çıkarabilirler (Anonim, 11.10.2021).

2.4. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, en yaygın maling kanserlerden biridir. Erkeklerde akciğer kanseri, prostat kanserinden sonra ikinci sıradadır ve yeni teşhis edilen kanserlerin %14'ünü oluşturur (Greenlee, 2001).

Akciğer kanserleri genel olarak küçük hücreli karsinomlar ve küçük hücreli olmayan karsinomlar olmak üzere iki şekilde sınıflandırılabilir. Küçük hücreli olmayan karsinomlar ayrıca skuamöz hücreli karsinomlar, adenokarsinomlar ve büyük hücreli karsinomlara ayrılır. Skuamöz hücreli karsinomlar, akciğer kanserlerinin yaklaşık %30'unu oluşturur. Bu tip tümör, sigara ile en yaygın olarak ilişkili olan iki tümörden biridir; diğeri ise küçük hücreli karsinomdur (Geddes, 1979).

Akciğer kanseri aynı zamanda kadınlarda (meme kanserinden sonra) en sık görülen ikinci kanserdir ve yeni teşhis edilen kanserlerin %12'sini oluşturur. Akciğer kanseri, hem erkeklerde hem de kadınlarda kanserden ölümlerin bir numaralı nedenidir. Kanserden ölen yaklaşık üç erkekten biri akciğer kanserinden, kanserden ölen dört kadından biri ise akciğer ve bronş kanserinden hayatını kaybetmektedir (MMWR, 1997).

Hem erkeklerde hem de kadınlarda akciğer kanseri sıklığı onlarca yıldır artmasına rağmen, erkeklerde sıklık 1984'te 100.000 nüfus başına 86.5 vaka ile zirve yapmış ve 1996'ya kadar yılda %1.4 oranında azalmıştır. Akciğer kanseri için en önemli risk faktörü sigara içmektir. Akciğer kanserine bağlı ölümlerin tahminen %75-80'i sigaradan kaynaklanmaktadır (MMWR, 1997).

Akciğer kanseri riski, günde içilen sigara miktarına ve sigara içilen yıla oranla artmaktadır. Sigarayı bıraktıktan sonra risk giderek azalır. Sigarayı bırakanların genel ölüm oranı, sigarayı bıraktıktan 15 yıl sonra sigara içmeyenlerinkine benzemektedir. Başka bir çalışmada, kadınlar arasında akciğer kanseri riskinin de sigarayı bıraktıktan sonra azaldığını bildirdi (Garfinkel ve Stellman, 1988).

Sigara içenlerle yaşayan veya çalışan kişiler, sigara içenlere yakın olmalarının bir sonucu olarak sigara dumanını soluyabilirler. Sigara dumanının pasif olarak solunması akciğer kanseri riskini artırır. Sigara içenlerle yaşayan sigara içmeyenler arasındaki akciğer kanseri vakalarının yaklaşık üçte biri pasif içiciliğe bağlanabilir (Wald ve ark., 1986).

Asbest, havadaki liflere maruz kalan kişilerde akciğer kanseri riskini arttırdığı bilinen bir kanserojendir. Risk, maruz kalma miktarıyla birlikte artar ve sigara içenlerde daha da yüksektir (Kjuus ve ark., 1986). Akciğer kanserlerinin yaklaşık %3-4'ü asbest maruziyetinden kaynaklanmaktadır (Omenn ve ark., 1986).

Radon, radyum 226'nın bozunmasıyla üretilen bir gazdır. Bu izotopun bozunması α parçacıkları yayan maddeler üretime yol açar. Bu parçacıklar, malign transformasyon potansiyelini artıran hücre hasarına neden olabilir (Ginsberg ve ark., 2001).

Radon, havalandırması yetersiz olan evlerde ve binalarda, özellikle bodrumlarda hapsolabilir. Radona maruz kalmak akciğer kanseri riskini artırabilir (Ginsberg ve ark., 2001).

Akciğer kanseri riskini artırabilecek ek maruziyetler arasında krom, nikel, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, inorganik arsenik bileşikler ve bis-(klorometil) eter bulunur. α1-antitripsin eksikliği aleli taşıyan kişilerin akciğer kanseri açısından daha büyük risk altında olabileceğine dair bazı kanıtlar vardır (Yang ve ark., 1998).

Skuamöz hücreli tümörler genellikle göğsün orta kısmında bulunur ve her 88 günde bir iki katına çıkarak nispeten yavaş büyüme eğilimindedir (Geddes, 1979).

Tümörler, belirti veya semptom üretecek kadar büyümeden birkaç yıl önce mevcut olabilmektedir. Skuamöz hücreli karsinomların merkezi yerleşimli kalma olasılığı en yüksektir. Adenokarsinomlar, sigara içmeyenlerde ve kadınlarda bulunan en yaygın akciğer kanseri türüdür (Geddes, 1979).

Akciğer kanserlerinin yaklaşık %30-40'ı adenokarsinom oluşturmaktadır. Akciğerin çevresine doğru büyüme eğilimindedirler ve her 161 günde bir iki katına çıkarlar. Adenokarsinomlar, skuamöz hücreli karsinomlardan daha yüksek metastaz yapma eğilimine sahiptir (Geddes, 1979).

Büyük hücreli karsinomlar en az görülen formdur ve akciğer kanserlerinin yaklaşık %10-15'ini oluşturur. Bu tümörler, 86 günde iki katına çıkarak, skuamöz hücreli kanserlerle karşılaştırılabilir bir oranda periferik bir konumda büyüme eğilimindedir. Adenokarsinomlar gibi, büyük hücreli kanserlerin de skuamöz hücreli karsinomlardan daha fazla metastaz yapma olasılığı vardır (Geddes, 1979).

Küçük hücreli karsinomlar, akciğer kanserlerinin yaklaşık %20-25'ini oluşturur. Merkezi konumlarda ortaya çıkma eğilimindedirler ve çok hızlı büyürler; iki katına çıkma süresi yaklaşık 29 gündür (Geddes, 1979).

2.5. Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar

Kanserin tedavisinde cerrahi yöntemler, kemoterapi, radyoterapi en sık kullanılan yöntemler olmanın yanında bu yöntemlerle birlikte hormon terapisi, biyolojik yöntemler, bitki ekstrakları, nanopartiküllerin kullanılması gibi farklı tedavilerde diğer yöntemlere yardımcı olacak şekilde kombin veya tek başına kullanılabilir (Baykara, 2015).

Her tedavi yöntemin kendine ait kolaylıkları ve zorlukları bulunması, tedavi gören kişinin tedaviye yanıtı, kanserin bireye spesifik bir hastalık olması, tedavilerin kişisel değişkenlikler gösterebilmesi nedeniyle tek ve kesin bir tedavi yönteminin olmasından bahsetmek neredeyse imkansızdır (Baykara, 2015).

2.5.1. Kemoterapi

Kemoterapinin asıl amacı kanser hücrelerini kemoterapötik moleküller veya bileşikler etkisi ile öldürmektir. Sitotoksik ve anti-neoplastik bileşikler bu tür tedavide başroldedir. Kemoterapi, cerrahi girişim öncesinde tümör yapısının küçültülmesi için kombin tedaviler veya tek başına uygulanabilir (Mian, 2016).

Kemoterapi tedavisinde kullanılan ilaçlar; kortikosteroidler, DNA da değişikliklere neden olan alkilleyici ajanlar, metabolik yolaklar üzerine etki eden anti metabolitler, anti kanser aktivitesi bulunan antibiyotikler, mitoz bölünme üzerine etki eden mitotik inhibitörler ve DNA'nın sarmal yapısını ve katlanmasının etkileyen topoizomeraz inhibitörleri gibi ilaçlardır.

Alkilleyici ajanlar, DNA'dan mRNA yazılımınını inhibe ederek protein translasyonunun durduran ajanlardır. Bu ajanların hücre içine girmesi sonucunda DNA üzerinde bulunan alkil grupları hidrojen atomları ile yer değişikliğine giderek ve karsinojen bir etki gösterir. Bu tip moleküller akciğer kanserleri yumurtalık kanserleri, meme kanserleri, lösemiler, multipl miyelom gibi kanserlerde ve başka birçok hastalık türünde tedavi amaçlı başarıyla kullanılmaktadır.

Kortikosteroidler, enflamasyon durumunu yavaşlatmak, bağışıklık sisteminin çalışmasını azaltmak ve kanserli hücrelerin hücre siklusunu durdurmak için kullanılan steroid benzeri ilaçlardır. Anti-metabolitler, metabolit olarak adlandırılan ve insan vücudunda enzimlerin sentezini ve çalışmasının uyarılmasında veya baskılanmasında kullanılan ilaçlardır. Ayrıca ve sinyal iletim yolaklarından sorumlu olan moleküllerin inhibe edilmesinini sağlayan spesifik moleküllerdir. Bu moleküller hücrenin normal şekilde çalışan metabolik yolaklarıda etkileyebilir. Hücrenin DNA'yı eşlediği faz sürecinde apotozu indükleyebilir (Yang, 2016).

Antitümör özelliğine sahip antibiyotiklermaling hücrelerde DNA/RNA sentezini inhibe ederek hücre büyümesini ve bölünmesini durduran kimyasallardır. Kan kanserleri ve mesane kanserlerinin tedavisinde çok yaygın olarak kullanılırlar (Patil, 2016).

Topoizomerazlar, DNA'nın transkripsiyonunu düzgün şekilde yapılabilmesi için bulunan, katlanmış yapının açılması ve düz bir forma getirilmesi için gerekli olan özel yapılardır. Topoizomeraz inhibitörleri, topoizomerazı inhibe ederek DNA'nın okunmasını engeller. Böylece DNA'nın çift ipliğinde oluşan tamir edilmesi imkansız kırıklar sebebiyle hücrenin programlanmış hücre ölüm yolağına girmesine neden olur. İrinotekan ve Topotekan gibi moleküller topoizomeraz I'i aktivitesini inhibe ederken, Teniposid ve Etoposid gibi topoizomeraz inhibitörler topoizomeraz II'nin işlevini yapmasına engel olurlar (Olsen ve ark., 2014; McPartlin ve ark., 2014).

2.5.2. Radyoterapi

Radyoterapi, kanserli hücrelerin gelişmelerini yüksek enerjili iyonize ışınlar kullanarak durdurmaya amaçlayan tedavi yöntemidir. Radyoterapi sadece vücudun spesifik bir bölgesini hedef alınabileceği gibi, tüm vücudu hedef alan tedaviler kullanılmaktadır.

Hastalığın durumu ve hastanın kişisel özelliklerine bağlı olarak birçok yöntem uygulanabilmektedir. Bu yöntemlerin geliştirilmesindeki temel amaç, gelişimi durdurulmak istenen maling hücreleri üzerine etkisinin maksimum olasını sağlmaktır. Fakat sağlıklı hücrelere ise çok az hasar verecek olan sistemler geliştirilmelidir. Kemoterapötik ajanlarla ile birlikte kombin tedavilerin yapılması bu yöntemin daha efektif olduğu kanıtlanmıştır (Hendriks ve ark., 2016).

Radyasyon tedavisininen büyük dezavantajlarından birisi birçok kanser tedavi yönteminde olduğu gibi maling hücreleri öldürürken sağlıklı dokuları da öldürmesidir. Ayrıca radyoterapi tedavilerinde saç kaybı, kusma, iştah kaybı, halsizlik gibi çok fazla görülen yan etkiler de hastanın hayatınıda çok fazla etkileyebilir.

2.5.3. Kök hücre tedavisi

Kök hücreler diğer tip hücrelere farklılaşabilme yeteneğine sahip hücrelerdir. Her kök hücre yeni bir kök hücresi oluşturabilme yeteneğine sahiptir. Kök hücreler bölünerek kök hücre olarak durabildiği gibi farklılaşma yoluna giderek başka türlerde hücrelere dönüşebilirler. Olgun hücrelerin aksine kendilerini bölünerek yenileyebilirler. Bu hücreler belli genleri veya sinyalleri ifade etmek üzere özel olarak farklılaştırılabilirler. Hücresel tedavilerde, yeniliksel tıpta, ilaç geliştirmede ve hastalıkların modellemesinde kullanılmaktadır (Takahashi ve Yamanaka, 2013; Jung ve ark., 2012).

Kök hücre tedavilerinde temel olarak üç tipe ayrılır. Bu tedavi yöntemlerinden birincisi kök hücre vericinin bir başka kişiden oluştuğu allojenik transplantasyon, ikincisi bireyin kendine ait kök hücrelerinin kullanıldığı otolog transplantasyon yöntemidir.

Son olarak üçüncüsü de kök hücre vericinin ve alıcının ikiz veya üçüz durum olan sinjeneik transplantasyondur.

Bir başka vericiden alınan kök hücrelerinin kullanıldığı tedavi yönteminin kullanılmasının en büyük olumlu yönü verici kişinin sağlıklı hücrelere sahip olması, kanserli hücreleri bulundurmamısıdır. Fakat en büyük dezavantajı ise alıcı ve verici arasındaki hücresel uyumunun sağlanamayışı durumudur. Böbrek kanserleri, kan kanserleri, miyelom ve lenfoid kanserler gibi kanser türlerinde bu tür tedavi başarıyla uygulanabilmektedir (Cho, 2013; Takeuchi, 2015).

2.5.4. Cerrahi yöntemler

Cerrahi yöntemler genellikle radyoterapi ve kemoterapi ile birlikte ya da her iki yöntemle aynı anda birlikte kullanılabilmektedir. Radyoterapi aynı zamanda tek başına da sıklıkla kullanılabilen yaygın bir yöntemdir. Oluşan kanserlerin engellenmesinde profilaktik olarak, tanı konma amaçlı dokudan bir parça alınması, metastaz veya yayılım göstermeyen durumlarda kanserli dokunun veya kitlenin vücuttan uzaklaştırılmasında genellikle kullanılmaktadır.

Çevredeki dokulara hasar vermeden tümör dokusunun çıkarmanın olası olmadığı durumlarda doktorun kitlenin bir parçasını alarak işleme devam etmeden önce kemoterapi veya radyoterapi kullanarak tümör dokusunun küçültülmesini tercih edebilir.

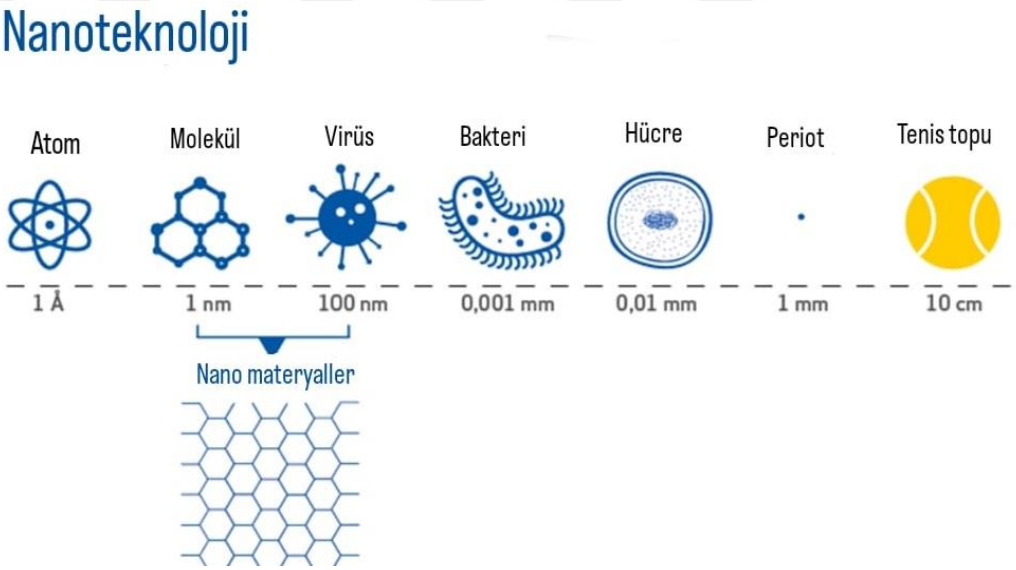
Tüm bu yöntemlerin dışında biyolojik tedavilerden olan immünoterapi, kanser aşıları, kanser büyüme baskılayıcıları, gen terapileri gibi yöntemlerde sıklıkla kullanılabilir. Ayrıca nanopartiküller de günümüzde çok farklı alanlarda kullanımı olan yapılardır. Özellikle çeşitli metal nanopartiküllerin antikanser potansiyellerini gösteren çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır.

2.6. Nanoteknoloji ve Nanomateryaller

Nanoteknoloji, Yunancada ‘cüce’ anlamına gelen nano kelimesi ile ‘teknik bilimler’ anlamına gelen teknoloji kelimelerinin birleşmesi ile oluşur.

Nanoteknoloji, nanometre (bir ölçü biriminin milyarda biri) boyutlarında malzeme tasarlayıp üretilmesini, bu üretilen malzemelerden yeni amaçlara yönelik aygıtlar ve ürünler üretmeyi amaçlayanlan bir alandır (Çıracı 2005).

Nano boyutlardaki çalışmalar, 1 ile 100 nm boyutundaki ürünler ve aygıt geliştirmekle ilgilidir (Şekil 2.4). 1-100 nm’den büyük olan materyaller nanomateryal olarak kabul edilmemektedir.

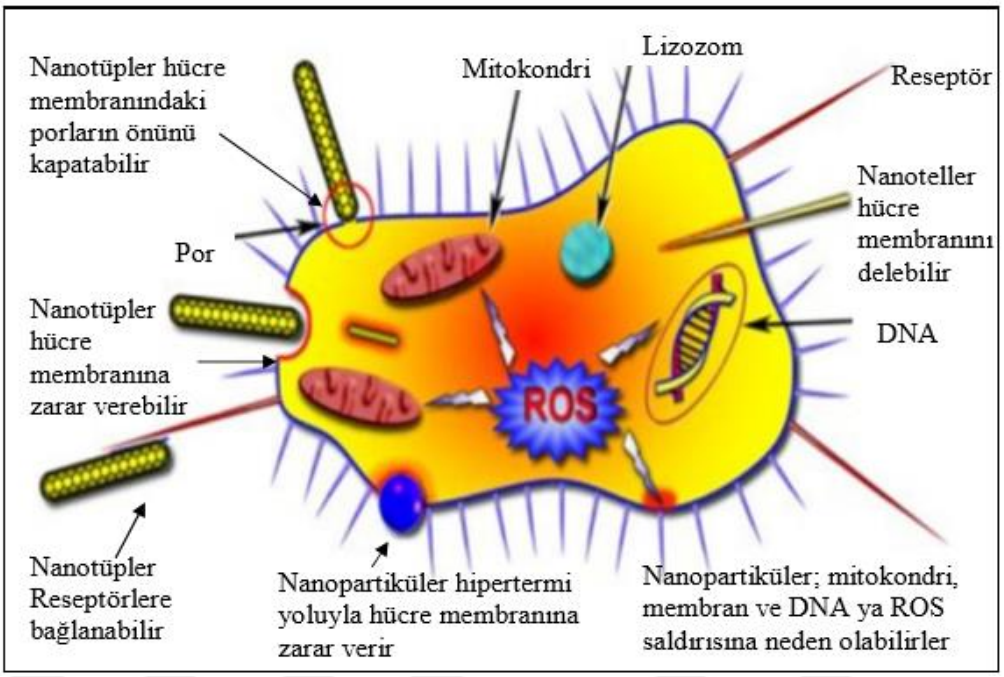


Şekil 2.4. Nanopartikül boyut karşılaştırması (Anonim, 2016).

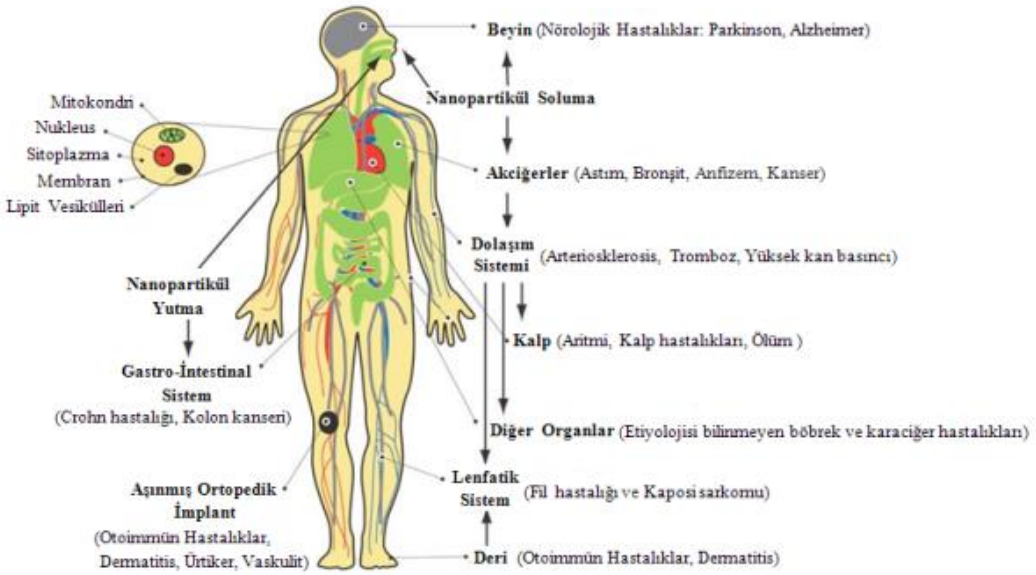
Nanomateryaller, nanopartiküller, nanotüpler, nanofiberler ve nanokompozitler olarak sınıflandırılmaktadır (Borm ve ark. 2006).

Nanopartiküller boyutları ve fizikokimyasal özelikleri nedeniyle birçok teknik alan ve tıbbi uygulamalarda büyük avantajlar sağlamaktadır. Çeşitli nanomateryaller farklı şekillerde insan vücuduna girerek hücrelerimizde farklı etkiler oluşturabilmektedir (Şekil 2.5 ve Şekil 2.6).

Gelişen yeni teknolojilerden biri olan Nanoteknoloji, bazı belirsizlik ve riskleri de beraberinde getirmektedir. Sahip olduğu özellikler açısından insan ve çevre açısından büyük yaralarının olabileceği gibi tahmin edilemez zararlı da olabilir (Borm ve ark. 2006; Kumbıçak, 2013).



Şekil 2.5. Nanopartiküllerin hücreler üzerindeki etki mekanizmaları (Han ve ark. 2011).



Şekil 2.6. İnsan vücuduna nanopartiküllerin giriş şekilleri ve etkilenen doku ve organlarda ortaya çıkabilecek bazı hastalıklar (Şekeroğlu, 2013).

Nanopartiküller de günümüzde çok farklı alanlarda kullanımı olan yapılardır. Özellikle çeşitli metal nanopartiküllerin antikanser potansiyellerini gösteren çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır.

Bu tez çalışmasında da $Al(OH)_3$ nanopartikülünün hem tek başına hem de akciğer kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan kemoterapik ilaç olan Etoposid ile birlikte, insan sağlıklı akciğer hücreleri ve kanser akciğer hücreleri üzerindeki olası sitotoksik ve genotoksik etkisi araştırılmıştır.

2.6.1. Metal nanopartikülleri

Metal nanopartiküller metal oksit, metal ve alaşım nanopartiküller olmak üzere birçok farklı şekilde bulunabilir. Bu nanopartiküllerin fizikokimyasal (Yüzey şekilleri, boyutları, iletkenlikleri vb.) özellikleri gibi birçok özelliği değişkenlik göstermektedir (Roduner, 2006).

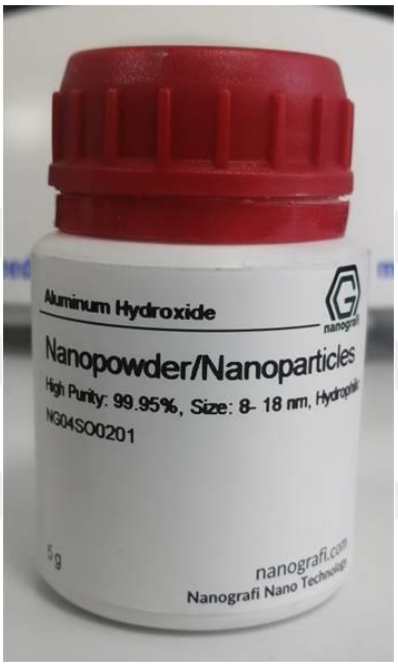
Metal nanopartiküller manyetik görüntüleme, antimikrobiyal ajan, katalizörler, güneş kremleri, ilaç uygulamaları, boya, kozmetik gibi birçok farklı alanda kullanılmaktadır (Schrand ve ark., 2010). Birçok özelliği göz önüne alındığında günümüzde birçok metal, metal oksit ve alaşım nano boyutlarda üretilmekte ve pek çok alanda kullanım olanağı bulmaktadır (Karlsson ve ark., 2008).

Örneğin, alüminyum (Al), bakır (Cu), titanyum dioksit (TiO_2), çinko (Zn) ve gümüş (Ag) nanopartiküller metal nanopartiküller insanlar tarafından kullanılan ürünlerde ve endüstriyel ürünlerde katkı maddesi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Altın nanopartiküllerinin, işlenmeleri ve yüzey şekillerinin değiştirilmesi oldukça kolay olduğundan ve DNA/RNA gibi birçok biyolojik molekül ile bağ oluşturabildiklerinden dolayı biyolojik görüntüleme, ilaç uygulamalarında, kanser terapisi, hedefe yönelik tedavilerde hücre işaretleme gibi alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır (Yah, 2013).

Alüminyum (Al) içeren nanopartikülleri ilaç geliştrilmesinde ve ilaçların kapsülasyonu gibi alanlarda giderek artan bir şekilde kullanılmaktadırlar (Kim ve ark., 2009; Schrand ve ark., 2010).

2.7. Alüminyum Hidroksit ($Al(OH)_3$) Nanopartikülü

Alüminyum hidroksit, dünyada en çok kullanılan alev yansıtıcısıdır. 200 ^oC'ye kadar ısıtılması ile alüminyum hidroksit %66 alüminyuma ve %34 suya kadar bozunabilir. Bu geri dönüşümlü süreç Alüminyum hidroksiti bir yangın geciktirici ve yavaşlatıcı yapmaktadır (Anonim, 2021a). Çalışmamızda kullanılan ürün Şekil 2.7'de gösterilmiştir.

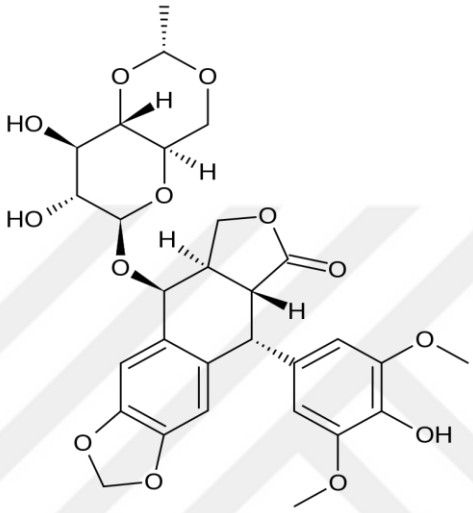


Şekil 2.7. Alüminyum Hidroksit ($Al(OH)_3$) Nanopartikülü

Alüminyum hidroksit toz olarak toksik olmayan özellikleri nedeniyle genellikle, endüstride doldurma, yangın sahalarında alev geciktirici ve duman giderici işlevi ile kullanılmaktadır ayrıca Alüminyum hidroksit plastikler, polyester, kauçuk ve diğer organik polimerler içine katılarak ideal bir alev geciktirici olarak kullanılır (Anonim, 2020).

2.8. Etoposid

Etoposid, (Şekil 2.8) testis kanseri, akciğer kanseri, lenfoma, lösemi, nöroblastom ve yumurtalık kanseri gibi bir dizi kanser türünün tedavisinde kullanılan bir kemoterapi ilacı hammadesidir. Ağız yoluyla veya damar içine enjeksiyonla kullanılır (Anonim, 2016).



Şekil 2.8. Etoposid'in moleküler yapısı (Anonim, 2016).

Etoposid, yabani adamotu (*Podophyllum peltatum*) (Şekil 2.9) kök sapından elde edilen podofillotoksinin yarı sentetik bir türevidir.

Yaygın yan etkileri arasında infüzyon bölgesi reaksiyonları, düşük kan basıncı, saç kaybı, uygulama yapılan damar bölgesinde ağrı ve/veya yanma, kabızlık veya ishal, metalik gıda tadı, kemik iliği baskılanması, beyaz küre sayısında azalma (enfeksiyonlara yatkınlığın artmasına yol açar), düşük alyuvar sayısı (anemi), düşük trombosit sayısı (kolay morarma ve kanamaya yol açar) etkileri görülür. Daha az yaygın görülen yan etkileri ise mide bulantısı ve kusma, alerjik tip reaksiyonlar, döküntü, genellikle damardan uygulamasından hemen ortaya çıkan ve enfeksiyona bağlı olmayan ateş, ağız yaraları gibi yan etkilere neden olabilir (Uzun, 2002).

Etoposid, topoizomeraz inhibitörü ilaç ailesindendir. Etoposid, DNA ve DNA'daki sarmalları gevşetmeye yardımcı olan bir enzim olan topoizomeraz II enzimi ile üçlü bir kompleks oluşturur.

Topoizomeraz II normal olarak bir DNA çift sarmalında bir kırılma oluşturacak, diğerinin geçmesine izin verecek ve kopan sarmalları yeniden bağlayacaktır. Etoposidin bağlanması, topoizomeraz II'nin yeniden bağlanmasını engeller. Topoizomeraz II tarafından yapılan DNA kırılmalarının kırık kalmasına neden olur (Pommier, 2010). Kanser hücreleri, daha hızlı bölündükleri için topoizomeraz aktivitesi daha yüksektir. Bu nedenle etoposidin sebep olduğu etki artmaktadır (Hande, 1998; Gordaliza, 2004).



Şekil 2.9. *Podophyllum peltatum* (Yabani adamotu) (Anonim, 2016).

3. MATERYAL YÖNTEM

Bu çalışmada $Al(OH)_3$ nanopartikülü ve Etoposid'in ayrı ayrı ve birlikte A549 (ATCC® CRM-CCL-185™) insan akciğer kanser hücreleri ve BEAS-2B (ATCC® CRL-9609™) insan sağlıklı bronşiyal epitel hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri, XTT testi ve klonojenik test yöntemi ile araştırılmıştır. Nanopartikül $Al(OH)_3$ ve Etoposid'in genotoksik etkileri araştırılması ise komet testi ile değerlendirilmiştir. Hücre içi reaktif oksijen seviyesine etkileri ROS testi ile ölçülmüştür.

Çalışmada kullanılan ekipmanlar Çizelge 3.1 de, sarf malzemelere ait bilgiler ise Çizelge 3.2 de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan cihazlar

Cihazlar	**Marka/Model**
Etüv	BINDER–CB 150
Soğutmalı santrifüj	SIGMA-2-16PK
Laminar akım kabini	BERNER Kabin
Hassas terazi	SHIMADZU-AUW220D
Terazi	RADWAG-WTB2000
Pastör fırını	Elektromag-M3025P
İnvert mikroskop	SOIF invert mikroskop
Floresan mikroskop	NIKON-ECLIPSE 80i Mikroskop
Işık mikroskobu	NIKON-ECLİPSE E100
Komet yazılımı	Kameram 21 programı
Elektroforez güç kaynağı	PeqLab-Reqpower 300
Elektroforez tankı	CleaverScientific
Mikroplaka okuyucu	BioTek, ELx800 U.S.A Elisa reader
Azot tankı	INT.CRYOGENICS–C 20R
Ph metre	HANNA–HI 221
+4 buzdolabı	REGALbuz dolabı
Manyetik Karıştırıcı	ISOTEX manyetik karıştırı
-20 derin dondurucu	ALASKA–ADF 06 Vv-20
-80 derin dondurucu	ELCOLD -80
Karıştırıcı-ısıtıcı	MTOPSMS300HS
Hücre sayım cihazı	CEDEXXS
Distile su cihazı	MP MINI PURE – DEST UP
Su banyosu	NÜVEBATH NBS

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzeme	Firma/ Katalog No
Serolojik pipet	COSTAR
Serolojik pipet tabancası	BIOHIT-MIDI PLUS/ Dragon MED Levoplus
Steril 15 ml'lik tüpler	ISOLAB
Steril flasklar(T-12,5, T-25 ve T75)	NEST BIOTECHNOLOGY
RPMI-1640 (500 ml)	PAN BIOTECH/ P04-22100
Penisilin-Streptomisin	SIGMA/ P0781
L-Glutamin (100 ml)	SIGMA/ RNBB4386
Fetal-Bovine serum	PANBIOTECH/ P30-1985
Sodyum pirüvat (100 ml)	PANBIOTECH/ P04-43100
EDTA disodium salt	CARLO ERBA/ 303201
DPBS	PANBIOTECH/ P04-36500
Etanol	MERCK
NaCl	MERCK/ 7647-14-5
NaOH	SIGMA/ S8045-1 KG
Triton X-100	GERBU/ 34021300
LowmeltingAgaroz	SIGMA/ A9414-25G
Normal Agaroz	SIGMA/ A9539-100G
DMSO	MERCK/ K39661843
Tripsin-EDTA	GIBCO/ 1304898
DCFH-DA (ROS Kit)	Cell Biolabs'OxiSelect™ / 59342021
Hücre proliferasyon kiti	BIOLOGICAL INDUSTRIES/1548576

3.2. Kullanılan Hücre Hatları ve Özellikleri

Bu tez çalışmasında A549 (ATCC® CRM-CCL-185™) insan akciğer kanser hücreleri ve BEAS-2B (ATCC® CRL-9609™) insan sağlıklı bronşiyal epitel hücreleri hatları kullanılmıştır. Hücreler 37 °C ve %5 CO_2 ortama sahip inkübatörde havalandırmalı T75 flasklar içinde inkübe edilmiştir. Flasklara bulunan besiyeri: 500 ml RPMI Medium +3 mL L- glutamine, +6 mL penisilin-streptomisin, + 50 mL FBS (Fetal Bovine Serum) +, 6 mL sodyum pirüvattan oluşmaktadır.

Hücrelerin pasajlama prosedürü;

Deney setleri kurulmak amacı ile % 80 doluluğa ulaşmış T75 flasklardaki besiyeri uzaklaştırılır. Bu sırasında canlı hücreler flask yüzeyine yapışık olduklarından hücreler flask tabanından ayrılmazlar. Hücreler daha sonra PBS (PhosphateBufferedSaline) ile yıkanır ve PBS flasktan uzaklaştırılır. Bu işlemin ardından flasklara tripsin eklenerek inkübatöre de 2-3 dk bekletilir, bu işlem flask tabanına yapışmış canlı hücrelerin flasktan ayrılmasını sağlar.

Tripsin reaksiyonunun durdurulması amacı ile eklenilen tripsin miktarı kadar besiyeri eklenir ve tüpteki hücreler 15 mL lik tüplere toplanarak $+4^0$C'de 2500 rpm de 5 dk boyunca santrifüj edilir. Santrifüj sonrası tüpteki süpernatant atılarak hücreler süspanse edilir. Yeni flasklarabesiyerleri eklendikten sonra hücre süspansiyonundan hücreler flasklara aktarılır.

3.3. $Al(OH)_3$ Nanopartikülü ve Etoposid'in Temini

$Al(OH)_3$ nanopartikülü 'Nanografi' şirketinden ticari olarak temin edilmiştir. Nanopartiküllerin sitotoksik ve genotoksik etkileri başta partikül büyüklüğünden etkilendiğinden dolayı 8-18 nm büyüklüğündeki $Al(OH)_3$ nanopartikülütercih edilmiştir. $Al(OH)_3$ nanopartikülünün şirket tarafından belirlenmiş özellikleri Tablo 3.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. $Al(OH)_3$ Nanopartikülünün şirket tarafından ölçülmüş özellikleri

Nanopartikülün Saflık Yüzdesi:	(%)99.95
Nanopartikülün Rengi:	Beyaz
Nanopartikülün Ortalama parçacık boyutu (nm):	8-18 nm
Nanopartikülün Özgül Yüzey Alanı (m^2/g):	>640

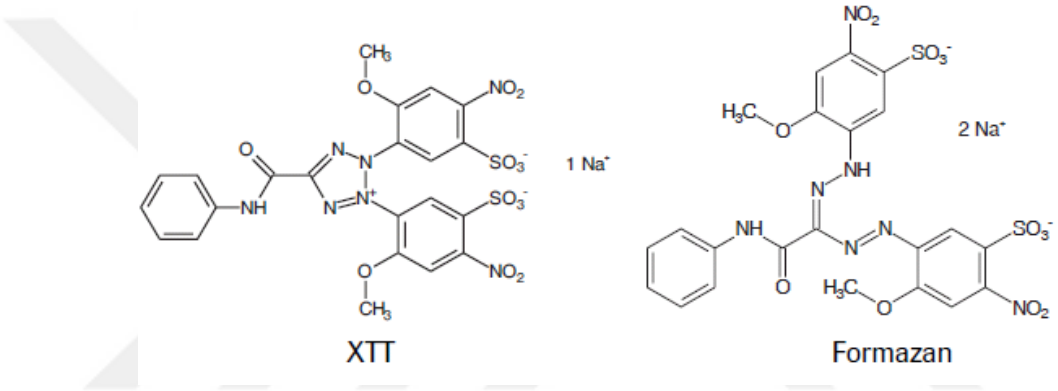
Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapik ajan olan etoposid ticari formu ONKO İlaç sanayi Ltd. San. A.Ş. tarafından üretilmektedir. Lastet 50 mg'lık kapsüller halinde satın alınmıştır (Şekil 2.8). Etoposid'in ticari formu kullanıldığında Etoposid ile ilgili doz hesaplamaları ilaç içerisinde bulunan Etoposid konsantrasyonuna göre hesaplanmıştır (Tablo3.4).

Çizelge 3.4. Etoposid'in ticari formunun içerisinde bulunan diğer maddeler ve konsantrasyonları

Etoposid	50 mg
Sitrik Asit	2,5 mg
Makrogol 400	577,7 mg
Konsantre Gliserin	18 mg
Hidroksi-propül Selüloz	1,8 mg

3.4. XTT Test Yöntemi

Hücre kültürü laboratuvarlarında sitotoksisite çalışmalarında birçok farklı yöntem ve teknik bulunmaktadır. Bu yöntemlerin başında spektrofotometrik yöntemler başta gelmektedir. XTT test yöntemi sitotoksisite çalışmalarında en çok kullanılan ve güvenirliliği yüksek olan bir yöntemdir. XTT test yöntemi tetrazolyum tuzlarının canlı hücreler tarafından formozankristallerine dönüştürmesine dayanan bir yöntemdir (Şekil 3.2.). Tetrazolyum tuzları sadece metabolik olarak aktif olan hücrelerde formozan kristallerine dönüşmektedir. Formozan kristalleribesiyerinde çözünmektedir dolayısıyla spektrofotometrik yöntemlerle ölçülebilmektedir (Scudierove ark., 1988).



Şekil 3.1. XTT, canlı hücrelerde metobolizasyonu sonucunda besiyerinde çözünebilen formozan kristallerine dönüşmektedir.

XTT Testi Protokolünün Uygulanması:

Hücrelerin 75 cm²'lik flasklarda %80 doluluğa ulaşanhücreler pasajlanarak 96 kuyucuklu platelere her kuyucukta 5000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler 37 °C ve %5 CO_2 ortamlı inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edildikten sonra besi yeri değiştirilmiş ve $Al(OH)_3$ nanopartikülünün 100µg/mL ile 10000 µg/mL arasında değişen farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Hücreler aynı şekilde etoposid için de 10 µM ile 1000 µM arasındaki konsatrasyonlarda 24 saat inkübe edilmiştir. Hem $Al(OH)_3$ nanopartikülü hem de Etoposid ile dozlanmış plateler 24 saatlik beklemeden sonra PBS ile yıkanmıştır ve ardından her kuyucuğa 100 µL yeni besiyeri eklenmiştir. Her bir kuyucuğa hazırlanmış ve aktive edilmiş XTT solüsyonu eklenerek 3 saat inkübe edilmek üzere bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda mikroplaka okuyucu ile 450nm'de absorbans (A) ölçülmüştür. Blankler çıkarıldıktan sonra (1- A muamele grubu / A kontrol) x 100 formülü kullanılarak poliferasyon eğrisi çizilmiştir.

Proliferasyon eğrisinden hem $Al(OH)_3$ nanopartikülü hem de Etoposid ayrı ayrı A549 ve BEAS-2B $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri hesaplanmıştır. Bu değerlerin hesaplanmasından sonra tezin amacı doğrultusunda Etoposid ve $Al(OH)_3$ nanopartiküllerin Etoposid $IC_{12,5}$-$Al(OH)_3$ IC_{75}, Etoposid $IC_{12,5}$-$Al(OH)_3$ IC_{50}, Etoposid $IC_{12,5}$-$Al(OH)_3$ IC_{25}, Etoposid IC_{50}-$Al(OH)_3$ IC_{50}, Etoposid IC_{25}-$Al(OH)_3$ IC_{25} kombin konsantrasyonları içinde yukarıda kombin belirtilen protokol uygulanarak sitotoksisite çalışmalarına devam edilmiştir.

3.5. Klonojenik Test Yöntemi

Bu test yöntemi bir hücrenin bölünüp çoğalması ve koloni oluşturabilme yeteneğine dayalı bir test yöntemidir. Klonojenik test yönteminde hücrelerin kontrol gruplarıyla kıyaslanarak hayatta kalma eğrileri çizilir.

Klonojenik test yöntemi genel olarak hücreler üzerinde radyasyonun etkinliğini araştırmak amacı ile kullanılsa da günümüzde sitotoksik ajanların etkinliğini araştırmak amacı ile de kullanılmaktadır. Bu test yönteminde 50 hücreden küçük koloniler yeteri kadar bölünmemiş sayılır ve koloni sayısına dahil edilmez (Franken ve ark., 2006).

Klonojenik test protokolünün uygulanması;

1) T75 flaskların içerisinde bulunan A549 ve BEAS-2B hücreleri %80 doluluğa ulaştıktan sonraflasklardaki hücreler tripsin kullanılarak kaldırılmış ve 15ml lik tüplere toplanmıştır. Tüplere toplanan hücreler +4 ^{0}C'de 2500 rpm'dasantrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında hücrelerin supernatant kısmı atılarak hücreler süspanse edilmiştir. Tüplere bulunan toplam hücre sayısı CEDEX hücre sayım cihazında hesaplanmıştır. Deney gruplarımızın sayısı kadar T25 flaska istediğimiz sayıda hücre eklenmiştir.

2) Ekimin ardından hücreler takip edilmiş ve hücreler T25 flasklarında %80 doluluğa ulaştıklarında flasklar $Al(OH)_3$ nanopartikülü ve etoposid ile XTT testinde kullanılan aynı konsantrasyonlarla dozlama yapılmıştır.

3) Dozlamanın üzerinden 24 saat sonra flakslardaki hücreler pasajlanarak ve 15 ml lik tüplere alınmıştır. Hücrelerde santrifüj işleminin ardından süpernatant kısımları uzaklaştırılmış ve kalan hücreler süspanse edilerek CEDEX cihazı kullanılarak canlı olan hücrelerin sayımı yapılmıştır.

4) Elde edilen canlı hücre sayım sonuçlar dikkate alınarak göre 60 mm'lik petri kaplarına 500 tane canlı hücre aktarılacak şekilde hesaplamalar yapılmış ve her doz için 4 farklı petri kabına 500 tane canlı hücre eklenmiştir. Bu işlemin ardından petri kapları 37 °C ve %5 CO_2 ortama sahip inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

Petrilerdeki hücrelerin koloni oluşturması için gerekli süre beklenmiş ve belli aralıklarla petriler invert mikroskopta kontrol edilmiştir.

Petrilerdeki koloniler belli büyüklüğe ulaştıklarında petrilerde ki besiyeri uzaklaştırılarak PBS ile yıkanmıştır. 0,5 gr toz halinde bulunan kristal viyole boyası 20 mL metanol içerisinde çözüldükten sonra 100 mL'ye dH_2O ile tamamlanarak hazırlanan boya ile petriler 5 dk boyanmış ve disitile su ile yıkanarak kurumaya bırakılmıştır.

5) Her bir petri kabındaki 50 tane hücre ve üzerinde hücre içeren koloniler sayılarak elde edilen sonuçlar tablo haline getirilmiştir.

6) Aşağıda gösterilen formül ile yüzde canlılık oranları (sitotoksisite) hesaplanmıştır.

$$\text{Yaşayabilirlik (sitotoksisite)} = \frac{\text{Petri kabı başıma düşen ortalama koloni sayısı}}{\text{Kontrol Petri kabında ki ortalama koloni sayısı}} \times 100$$

3.6. Komet Testi

Günümüzde genotoksik ajanların DNA üzerindeki etkilerinin araştırılması amacı ile Mikronukleus, GamaH2AX, HPRT, Halo gibi birçok genotoksisite testi kullanılmaktadır. Bu test yöntemlerinden biri olan komet test yöntemi diğer birçok yönteme göre uygulanması açısından kolay ve maliyeti görece daha düşüktür. Komet test yöntemi DNA üzerindeki tek veya çift zincir kırıklarının belirlenmesinde kullanılan yaygın bir yöntemdir.

Komet test yönteminin prensibi DNA üzerindeki kırıkların farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektriksel yüklere sahip olmalarına ve bundan dolayı elektroforetik ortamda farklı hızlarda hareket etmelerine dayanmaktadır. Elektroforetik ortamda yürütülen DNA'lar daha sonra yaygın olarak kullanılan etidyum bromür gibi DNA'yı boyayan boyalar ile boyanarak mikroskobik yöntemlerle görüntülene bilmektedir (Dikilitaş ve Koçyiğit 2010).

Komet Testi Protokolünün Uygulanması:

T75cm^2'lik flasklarda büyütülen A549 ve BEAS-2B hücreleri %80 doluluğa ulaştıktan sonra hücreler pasajlanmıştır. Toplanan hücreler T25 cm^2'lik flasklara bölünerek çoğalması için inkübasyona bırakılmıştır.

İki hücre hattı için ayrı ayrı elde edilmiş olan sitotoksisite sonuçlarıyla hesaplanmış olan IC_{75}, IC_{50}, IC_{25} ve $IC_{12,5}$ değerleri hem Etoposid hemde $Al(OH)_3$ nanopartikülü için T25'lik flasklarda dozlanmıştır.

Ayrıca iki hücre hattı içinde $Al(OH)_3$ nanopartikülünün Etoposid'in genotoksik etkisi üzerine ne gibi etkisisinin olacağına araştırmak amacı ile Etoposid $IC_{12,5}$-$Al(OH)_3$ IC_{75}, Etoposid $IC_{12,5}$-$Al(OH)_3$ IC_{50}, Etoposid $IC_{12,5}$-$Al(OH)_3$ IC_{25}, Etoposid IC_{50}-$Al(OH)_3$ IC_{50}, Etoposid IC_{25}-$Al(OH)_3$ IC_{25} kombin konsantrasyonlar uygulanmıştır. Dozlanan hücreler 24 saat sürenin sonrasında tripsin ile muamele edilerek kaldırılmış 15 mL lik tüplere alınarak 5 dk santrifüj edilmiştir.

1) Bu aşamadan sonrasında yapılan işlemler doğrudan ışıktan kaçınarak karanlık bir ortamda gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra kalan hücreler 1 mL PBS ile seyreltilerek ve iyicesüspanse edilmiştir.

2) Komet testinde kullanılan lamlar işlem kolaylığı olması adına işlemdenbir gün önce agarla kaplanarak hazırlanmıştır. Lamlar 0,75 gr normal meltingagaroz 100 mL dH_2O'da çözülerek hazırlanmış olan karışıma lamların rodajlı olan kısımlarına kadar gelecek şekildeagarla kaplanmıştır. Lamların rodajlı olan kısımları deney gruplarımıza uygun şekilde etiketlenmiştir.

3) Hücreleri jel içine gömme işlemi için, düşük erime noktalı agaroz (LMA) kullanılmıştır. 0,065 gr LMA tartılmış ve 10 mL PBS içinde ısıtılarak karışım hazırlanmıştır.

4) 2 mL ependorf tüplere 250'şer µL lowmeltingagaroz (LMA) bölünmüş ve bu ependorf tüpleri 37 °C'de su banyosuna yerleştirilerek bekletilmiştir.

5) Hücre süspansiyonlarından 100 µL çekilmiş, su banyosunda bekleyen ve içinde 250 µL LMA bulunan ependorf tüplerine eklenerekiyice karıştırılmıştır.

6) Elde edilen karışım her deney grubu için daha önceden etiketlenmiş olan lamlar üzerine ayrı ayrı yayılarak lameller kapatılmıştır.

7) Üzerine karışımdan koyulan lamlar hemen lamelle kapatılmış ve yayma işlemi tamamlandıktan sonra lamlar 15 dakika +4 °C de bekletilerek LMA'nın donması sağlanmıştır.

8) 15 dakika sonra donmuş olan agar kaplı lamlardan lameller dikkatli bir şekilde ayrılmıştır.

9) Lamellerinden ayrılmış olan lamlar içerisinde lizis solüsyonu bulunan şalelere dizilerek bir gece boyunca karanlıkta ve +4 °C debuzdolabında bekletilmiştir.

10) Elektroforez tankına lizis solüsyonunda bekletilmiş olan lamlar elektroforez tankına dizilmiştir. Elektroforez tankı yürütme tampon çözeltisi ile doldurulmuş ve lamlar 30 dakika yürütme tamponunun içinde akım verilmeden bekletilmiştir.

11) Yürütme işlemi güç kaynağı 500 mA, 25V'da, yarım saatte gerçekleştirilmiştir.

12) Yürütme işlemi bittikten sonra lamlar tanktan çıkarılarak daha önce hazırlanmış olan ve soğuk olarak bekletilen nötralizasyon tamponuna konularak 5 dakika nötrolizasyon tamponu içerisinde karanlık ortamda bekletilmiştir.

13) Nötralizasyon işlemi ardından lamlar tampon çözeltiden çıkarılarak soğuk distile su ile yıkanmış ve kuruması için temiz bir ortamda beklenmiştir.

15) Kuruduktan sonra lamlar %99 etanol içinde 5 dakika fikse edilerek boyama işlemine hazır hale getirilmiştir.

Boyama İşlemi

Boyama işlemi bir DNA boyası olan etidyum bromürle (EtBr) yapılmıştır 20 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan EtBr boya solüsyonundan enjektör yardımı ile 0,2 mL çekilerek lamlara damlatılır. Boya damlatılan lamlar lamellerle kapatılıp, mikroskobik inceleme için hazırlanır.

Komet preperatlarının mikroskop yardımı ile incelenmesi

Boyanmış preperatların sayım ve değerlendirme aşamaları için floresan mikroskop kullanılmıştır. Her preperattan 100'er tane hücre sayılmıştır. Komet sonuçlarının değerlendirilmesi kameram 21 ve mikrosistem komet programı (Argenit İstanbul) kullanılarak yapılmıştır. Her preperattan fotoğrafı çekilen komet görüntülerinin kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA miktarları ve Olive kuyruk moment (OTM) ölçülmüştür.

Komet Testinde Protokolünde Kullanılan Tampon Çözeltilerin Hazırlanması;

Lizis Çözeltsinin Hazırlanması;

29,22 gr NaCl, 7,4448 gr Na_2EDTA ve 0,2422 Tris tartılarak 178 mL dH2O' da çözülmüştür. Çözeltinin pH'ı NaOH ile pH 10' a ayarlanmıştır. Deneyden 15 dk önce 2 mL Triton X 100 ve 20 mL DMSO çözeltiye eklenerek hazırlanan bu solüsyon kullanılacak aşamaya kadar +4 °C de bekletilmiştir.

Yürütme Tamponun Hazırlanması;

0,56 gr Na_2EDTA ve 18 gr NaOH, tartılarak 1,5 L dH_2O' da çözülmüştür. Çözeltinin pH'ı NaOH ile 13' e ayarlanmıştır. Tamponun hazırlanması sırasında soğuk olmasına dikkat edilmiştir. Yürütme tamponu elektroforez tankına eklenınceye kadar +4 °C de bekletilmiştir.

Nötralizasyon Çözeltisinin Hazırlanması

Nötralizasyon çözeltisi için 4,8456 gr Tris tartılmış ve 100 mL dH2O' da çözülmüştür. pH'ı 7,5'e ayarlanarak kullanılıncaya kadar buzdolabında +4 °C de bekletilmiştir.

3.7. ROS Testi

Bu test yöntemi ile Etoposid'in ve $Al(OH)_3$ nanopartikülünün ayrı ayrı ve kombin konsantrasyonlarının hücre içi reaktif oksijen oluşumuna etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) hücre içerisinde hücresel esterazların etkisi ile 2',7'-dichlorodihydrofluorescin (DCFH) dönüşür. DCF-DA ve DCFH'ın floresan özelikleri yoktur. Fakat oluşan DCFH reaktif oksijenlerin varlığında okside olarak 2',7'- dichlorodihydrofluorescein (DCF) ye dönüşmektedir. Oluşan DCF'nin floresan özelliği olduğu bilinmektedir (Eruslanov ve Kusmartsev, 2010).

ROS Testi Protokolünün uygulanması

ROS testi için A549 ve BEAS-2B hücreleri $T75cm^2$'lik flasklarda çoğaltılmıştır. Çoğalan hücreler toplanarak 96 kuyucuklu siyah platelere 10000 hücre/ kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir ve 24 saat boyunca 37 °C ve %5 CO_2 ortama sahip inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Bu süreç sonunda besi yeri değiştirildikten sonra hücreler 2 kez PBS ile yıkanmıştır. Hücrelere 1X DCFH-DA/RPMI çözeltisinden 200'er µL eklenmiş ve 37 °C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücreler 2 kez PBS ile tekrar yıkanmıştır. Bu süreç sonunda DCFH-DA hücrelerin içerisine girmiştir. Etoposid'in ve $Al(OH)_3$ nanopartikülünün XTT testi ile belirlenmiş IC_{75}, IC_{50}, IC_{25} ve $IC_{12,5}$ konsantrasyonları ile muamele edilmiştir.

Ayrıca Etoposid'in ve $Al(OH)_3$ nanopartikülünün kombin konsantrasyonlarınında hücre içi ROS seviyelerine etkisi araştırılmıştır. ROS kaynağı olarak bilinen H_2O_2'nin IC_{50} dozu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Bu işlemlerden sonra Absorbansı 480 nm/530 nm'de florometrik plaka okuyucuda plateler 24 saat süresince belirli aralıklarla kinetik olarak okunmuştur.

ROS değerleri florometrik okuyucadan alınan değerlerin ortalaması ile hesaplanmıştır. Deneyler iki tekrarlı şekilde gerçekleştirilmiştir ve değerler ortalama göreceli floresans unitesi (RFU) olarak verilmiştir.

3.8. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler tamamı SPSS 23 paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar normal dağılıma uygun olup olmalarına göre veri setine uygun olan parametrik ve nonparametrik test yöntemleri kullanılmıştır.

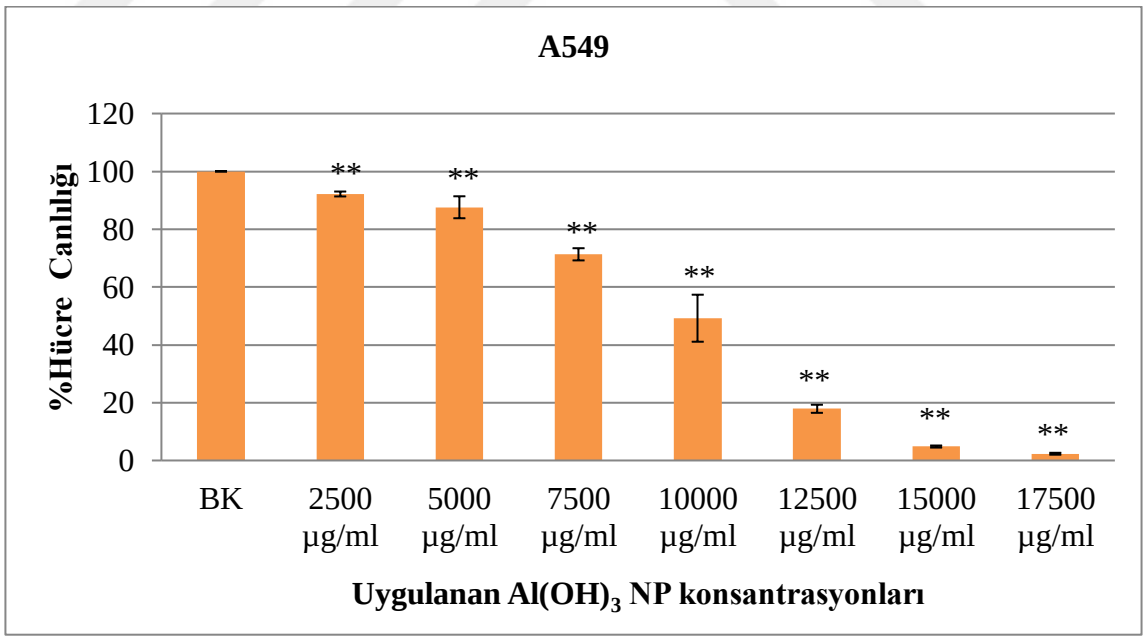
4. BULGULAR

4.1. XTT Bulguları

$Al(OH)_3$ nanopartikülü ve Etoposid'in hem A549 hemde BEAS-2B hücre hatlarında sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlardan her iki madde için ve her iki hücre hattı için IC_{75}, IC_{50}, IC_{25} ve $IC_{12,5}$ değerleri hesaplanmıştır.

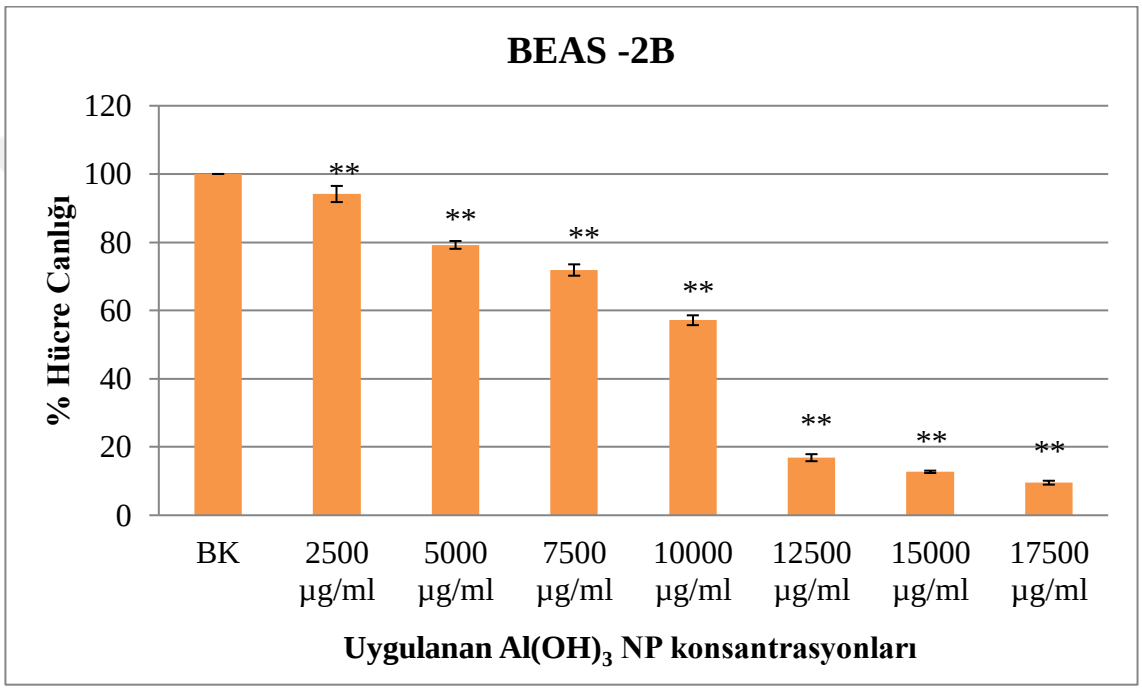
4.1.1. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında $Al(OH)_3$ nanopartikülü için elde edilen XTT sonuçları

A549 hücre hattının $Al(OH)_3$ nanopartikül ile 24 saat süre muamele edilmesi sonucu elde edilen veriler Çizelge 4.1. ve Şekil 4.1 de gösterilmiştir. $Al(OH)_3$ nanopartikülünün A549 hücre hattında $IC_{12,5}$ IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerler sırasıyla 2414,29 ± 88,60 µg/mL, 4828,58 ± 177,21 µg/mL, 9657,179 ± 354,42 µg/mL, 14485,76 ± 531,63 µg/mL olarak hesaplanmıştır. XTT deney sonuçlarında $Al(OH)_3$ nanopartikülünün konsantrasyonunun artmasına paralel olarak büyüme kontrolle kıyaslandığında hücre canlılığında anlamlı azalma olduğu One-way Anova ve Tamhane testi ile belirlenmiştir ($p<0,001$).



Şekil 4.1. A549 hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikülü ile 24 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri. BK: Büyüme kontrol (**: $p<0,001$ BK ile karşılaştırıldığında)

BEAS-2B hücre hattının $Al(OH)_3$ nanopartikül ile 24 saat süre ile muamele edilmesi sonucu elde edilen veriler Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir. $Al(OH)_3$ nanopartikülünün BEAS-2B hücre hattında $IC_{12,5}$ IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerler sırasıyla 2439 ± 34,60 µg/mL, 4879 ± 69,21 µg/mL, 9758 ± 138,42 µg/mL, 14637,76 ± 207,63 µg/mL olarak hesaplanmıştır. XTT deney sonuçlarında dozun artmasına paralel olarak büyüme kontrolle kıyaslandığında hücre canlılığında anlamlı azalma olduğu One-way Anova ve Tamhane testi ile belirlenmiştir ($p<0,001$).



Şekil 4.2. BEAS-2B hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikülü ile 24 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri. BK: Büyüme kontrol (**: $p<0,001$ BK ile karşılaştırıldığında)

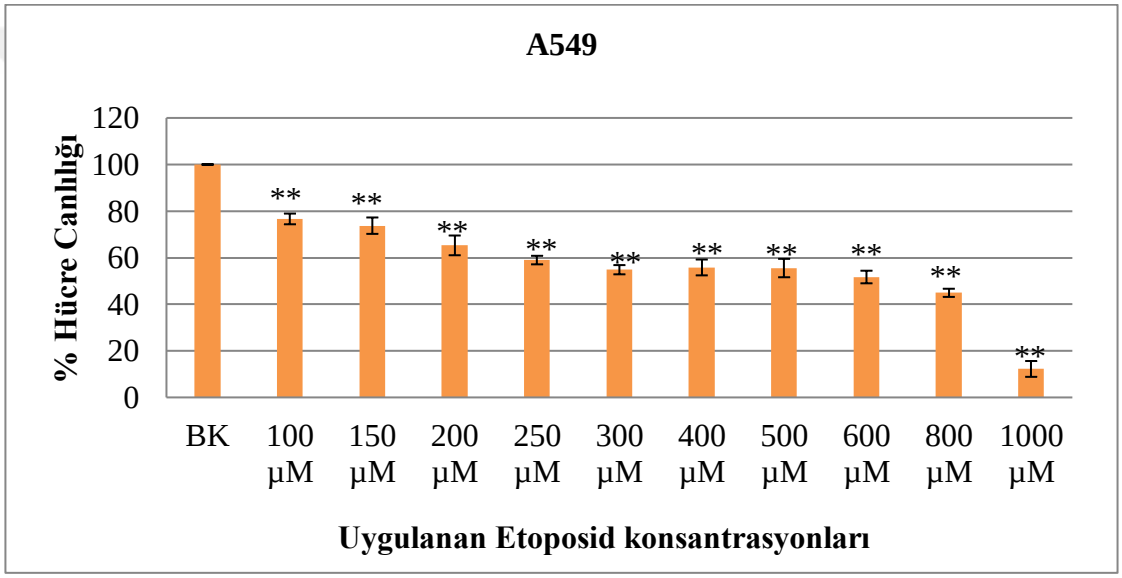
Çizelge 4.1. $Al(OH)_3$ nanopartikülünün A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında 24 saat sonunda elde edilen yüzde canlılık değerleri

	A549	**BEAS 2B**
BK	100	100
2500 µg/mL	92,17±0,85**	94,13±2,36**
5000 µg/mL	87,58±3,79**	79,21±1,14**
7500 µg/mL	71,31±2,10**	71,85±1,66**
10000 µg/mL	49,20±8,13**	57,14±1,44**
12500 µg/mL	17,87±1,39**	16,86±1,02**
15000 µg/mL	4,81±0,35**	12,72±0,34**
17500 µg/mL	2,32±0,32**	9,54±0,57**

BK: Büyüme kontrol (**: $p<0,001$ BK ile karşılaştırıldığında)

4.1.2. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında Etoposid için elde edilen XTT sonuçları

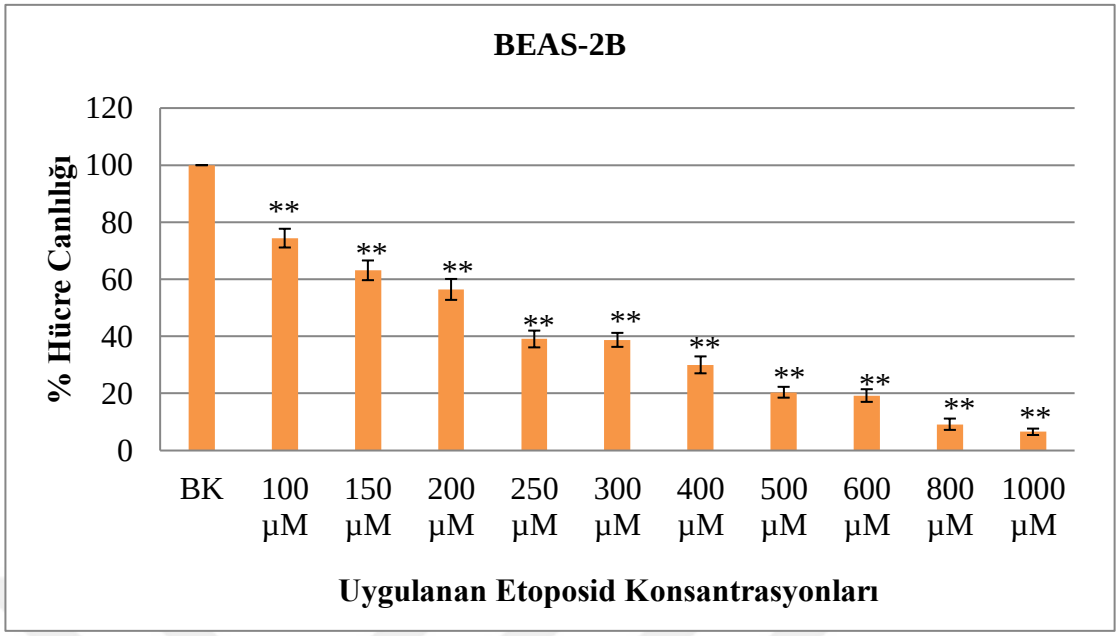
A549 hücre hattının Etoposid ile 24 saat süre ile muamele edilmesi sonucu elde edilen veriler Şekil 4.3. ve Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Etoposid için A549 hücre hattında $IC_{12,5}$ IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri sırasıyla 141,15 ± 4,47 µM, 282,3 ± 8,95 µM, 564,6 ± 17,9 µM, 846,9 ± 26,85 µM olarak hesaplanmıştır. XTT deney sonuçlarında Etoposid konsantrasyonunun artmasına paralel olarak büyüme kontrolle kıyaslandığında hücre canlılığında anlamlı azalma olduğu One-way Anova ve Tamhane testi ile belirlenmiştir ($p<0,001$).



Şekil 4.3. A549 hücre hattında Etoposid ile 24 saat muamelesi sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri. BK: Büyüme kontrol(**: $p<0,001$ BK ile karşılaştırıldığında)

BEAS-2B hücre hattının Etoposid ile 24 saat süre muamele edilmesi sonucu elde edilen veriler Çizelge 4.2. ve Şekil 4.4. de gösterilmiştir. Etoposid için BEAS-2B hücre hattında $IC_{12,5}$ IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerler sırasıyla 68,025 ± 9,6 µM, 136,05 ± 19,2 µM, 272,1 ± 38,4 µM, 408,15 ± 57,6 µM olarak hesaplanmıştır.

XTT deney sonuçlarında konsantrasyonunartmasına paralel olarak büyüme kontrolle kıyaslandığında hücre canlılığında anlamlı azalma olduğu One-way Anova ve Tamhane testi ile belirlenmiştir ($p<0,001$).



Şekil 4.4. BEAS-2B hücre hattında Etoposid ile 24 saat muamelesi sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri BK: Büyüme kontrol (**: p<0,001 BK ile karşılaştırıldığında)

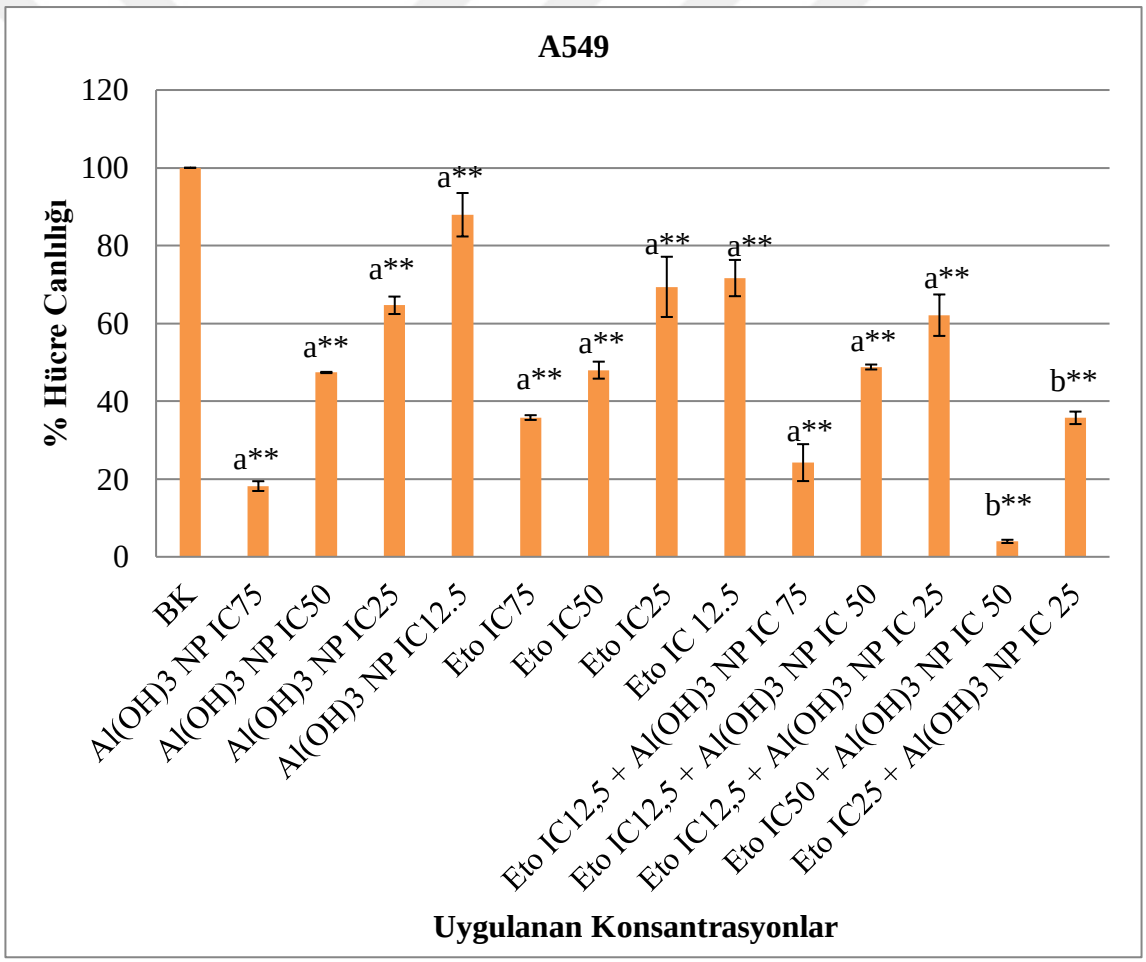
Çizelge 4.2. Etoposid'in A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında 24 saat sonunda elde edilen yüzde canlılık değerleri

	A549	**BEAS-2B**
BK	100	100
100 µM	76,63±2,3**	74,42±3,28**
150 µM	73,74±3,52**	63,15±3,45**
200 µM	65,28±4,24**	56,46±3,67**
250 µM	58,97±1,83**	39,08±2,94**
300 µM	54,83±1,98**	38,77±2,45**
400 µM	55,81±3,4**	30,02±2,96**
500 µM	55,54±3,95**	20,42±1,9**
600 µM	51,69±2,7**	19,27±2,22**
800 µM	44,91±1,75**	9,21±1,98**
1000 µM	12,23±3,4**	6,56±1,12**

BK: Büyüme kontrol (**: p<0,001, BK ile karşılaştırıldığında)

4.1.3. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında $Al(OH)_3$ nanopartikülü ve Etoposid'in kombin konsantrasyonları için elde edilen XTT sonuçları

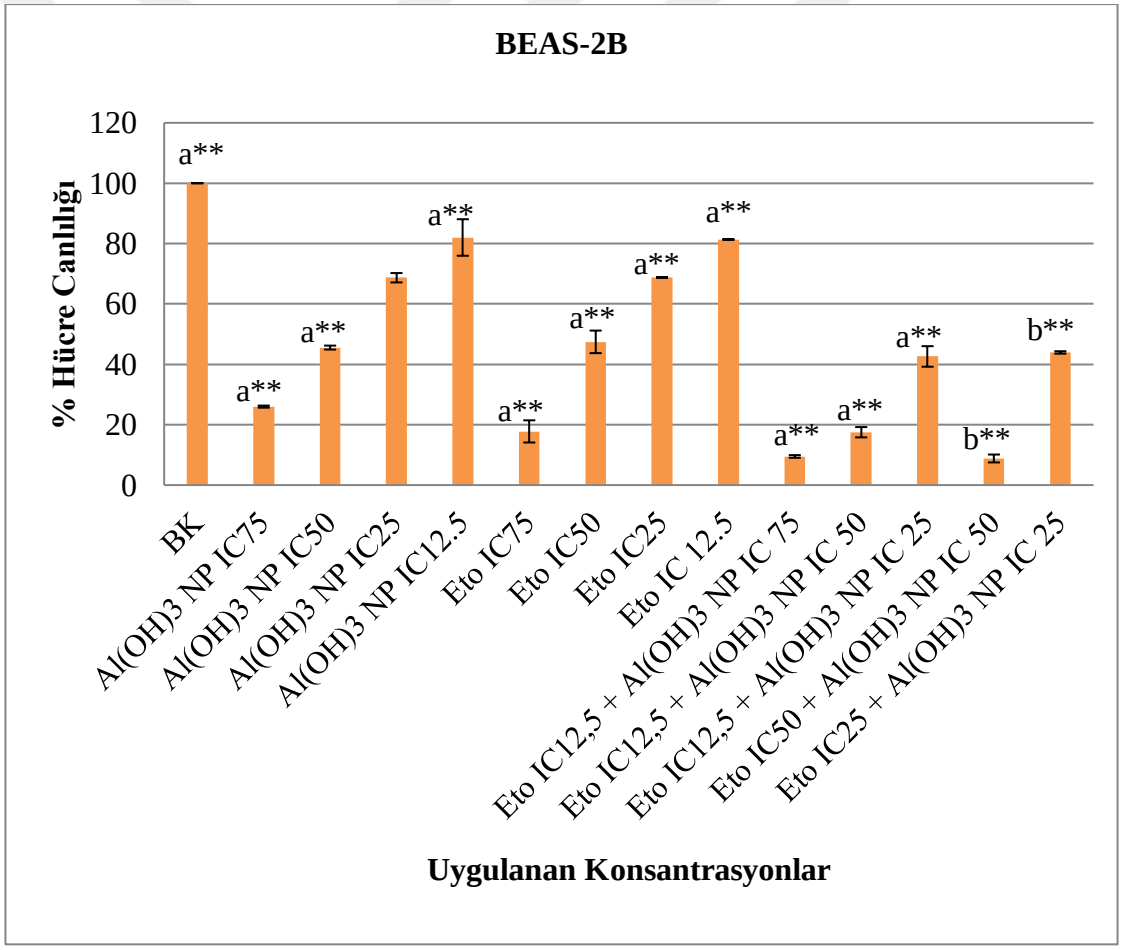
A549 hücre hattının $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen veriler Şekil 4.5. ve Çizelge 4.3'de gösterilmiştir. $Al(OH)_3$ nanopartikülünün ve Etoposid'in kombin konsantrasyonları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kontrol gurubu ile anlamlı farklılık bulunduğu One-way Anova ve Tamhane testi ile belirlenmiştir. Ayrıca Etoposid'in etkinliğinin $Al(OH)_3$ nanopartikülü ile arttığı ve bu etkinlik artışının istatistiksel olarak anlamlılığı Tukey HSD ve Tamhane testi ile belirlenmiştir ($p<0,001$).



Şekil 4.5. A549 hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin konsantrasyonlarıile 24 saat muamelesi sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri BK; Büyüme kontrol, Eto; Etoposid (a kontrol grubu ile karşılaştırılması ($p<0,001$**), b Etoposid'in aynı konsantrasyonu ile karşılaştırılması ($p<0,001$**)

BEAS-2B hücre hattının $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin konsantrasyonları ile 24 saat süre ile muamele edilmesi sonucu elde edilen veriler Çizelge 4.3. ve Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

BEAS-2B hücrelerinde $Al(OH)_3$ nanopartikülünün ve Etoposid'in kombin konsantrasyonlarının kontrol grubu ile karşılaşırıldığında hücre canlılığı açısından kontrol grubu ile anlamlı farklılık bulunduğu One-way Anova ve Tamhane testi ile belirlenmiştir. Ayrıca Etoposid'in etkinliğinin $Al(OH)_3$ nanopartikülü ile etkinliğinin arttığı ve bu etkinlik artışının da istatistiksel olarak anlamlı olduğu Tukey HSD testi ile belirlenmiştir ($p<0,001$).



Şekil 4.6. BEAS-2B hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri BK; Büyüme kontrol, Eto; Etoposid (a kontrol grubu ile karşılaştırılması $p<0,001$**, b Etoposid'in aynı konsantrasyonu ile karşılaştırılması $p<0,001$**).

Çizelge 4.3. A549 ve BEAS-2B hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri.

	A549	**BEAS-2B**
BK	100	100
$Al(OH)_3$ NP IC_{75}	18,17±1,25 a**	25,98±0,34 a**
$Al(OH)_3$ NP IC_{50}	47,38±0,15 a**	45,54±0,65 a**
$Al(OH)_3$ NP IC_{25}	64,65±2,24 a**	68,67±1,55 a**
$Al(OH)_3$ NP $IC_{12.5}$	87,93±5,58 a**	82,01±6,05 a**
Eto IC_{75}	35,79±0,60 a**	17,77±3,67 a**
Eto IC_{50}	47,98±2,18 a**	47,44±3,73 a**
Eto IC_{25}	69,39±7,74 a**	68,77±0,07 a**
Eto $IC_{12.5}$	71,65±4,66 a**	81,35±0,15 a**
Eto $IC_{12,5}$ + $Al(OH)_3$ NP IC_{75}	24,21±4,74 a**	9,47±0,44 a**
Eto $IC_{12,5}$ + $Al(OH)_3$ NP IC_{50}	48,79±0,63 a**	17,50±1,70 a**
Eto $IC_{12,5}$ + $Al(OH)_3$ NP IC_{25}	62,11±5,32 a**	42,60±3,40 a**
Eto IC_{50} + $Al(OH)_3$ NP IC_{50}	3,96±0,41b**	8,807±1,30 b**
Eto IC_{25} + $Al(OH)_3$ NP IC_{25}	35,72±1,60b**	43,93±0,40 b**

BK; Büyüme kontrol, Eto; Etoposid(a kontrol grubu ile karşılaştırılması $p<0,001$**, b etoposidin aynıdozu ile karşılaştırılması $p<0,001$

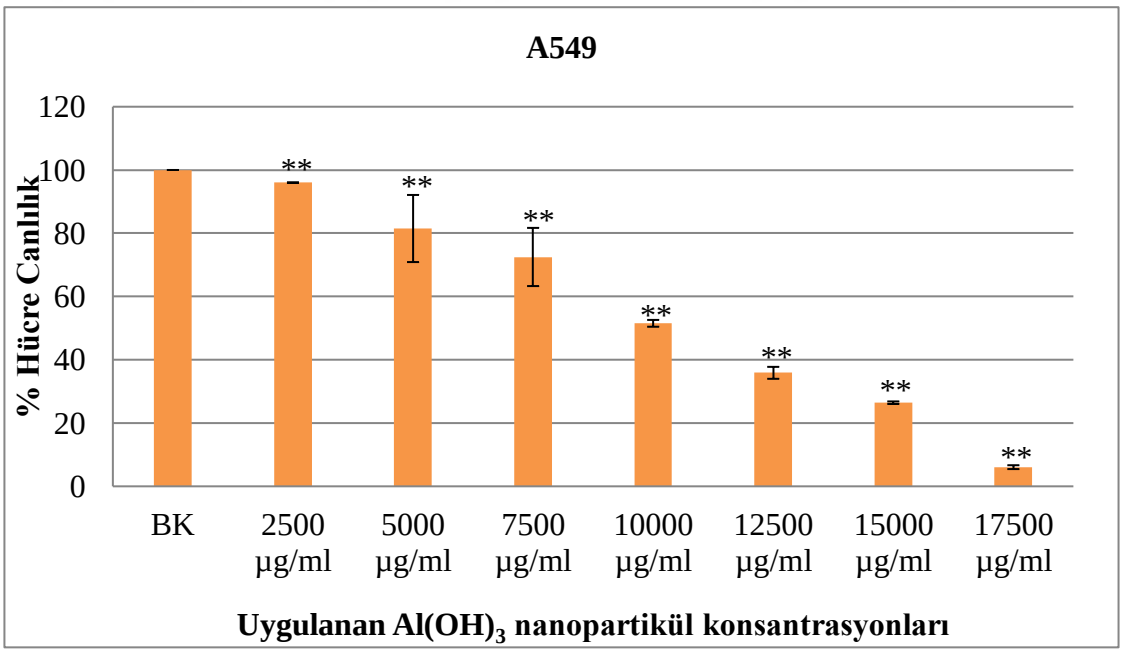
4.2. Klonojenik Test Bulguları

$Al(OH)_3$ nanopartikülü ve Etoposid'in hem A549 hemde BEAS-2B hücre hatlarında sitotoksik etkileri klonojenik test yöntemkullanılarak araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlarda her iki maddeiçin ve her iki hücre hattı için IC_{75}, IC_{50}, IC_{25} ve $IC_{12,5}$ değerleri hesaplanmıştır.

4.2.1. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında $Al(OH)_3$ nanopartikülü için elde edilen klonojenik testi sonuçları

A549 hücre hattının $Al(OH)_3$ nanopartikül ile 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen veriler Şekil 4.7 ve Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

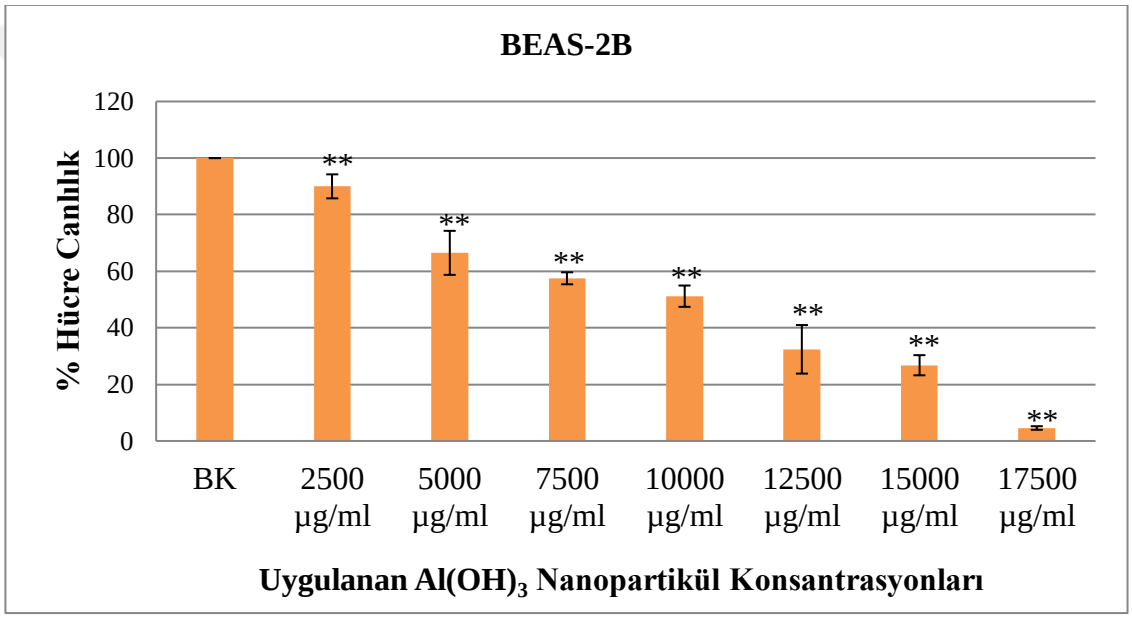
$Al(OH)_3$ nanopartikülünün A549 hücre hattında $IC_{12,5}$ IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerler sırasıyla 2541,25 ± 129,91 µg/mL, 5082,5 ± 259,82 µg/mL, 10165,1 ± 519,64 µg/mL, 15247,65 ± 779,46 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Klonojenik test deney sonuçlarında dozun artmasına paralel olarak büyüme kontrolle kıyaslandığında anlamlı azalma olduğu One-way Anova ve Tukey HSD testi ile belirlenmiştir ($p<0,001$).



Şekil 4.7. A549 hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikülü ile 24 saat muamelesi sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri. BK büyüme kontrol (**; $p<0,001$ BK ile karşılaştırılmıştır.)

BEAS-2B hücre hattının $Al(OH)_3$ nanopartikül ile 24 saat süre ile muamele edilmesi sonucu elde edilen veriler Şekil 4.8 ve Çizelge 4.4'de degösterilmiştir. $Al(OH)_3$ nanopartikülünün BEAS-2B hücre hattında $IC_{12,5}$ IC_{25}, IC_{50} ve IC_{75} değerleri sırasıyla 2360,22 ± 50,36 µg/mL, 4720,44 ± 100,72 µg/mL, 9440,89 ± 201,45 µg/mL, 14161,33 ± 302,17 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

Klonojenik test deney sonuçlarında dozun artmasına paralel olarak büyüme kontrolle kıyaslandığında anlamlı azalma olduğu One-way Anova ve Tukey HSD testi ile belirlenmiştir ($p<0,001$).



Şekil 4.8. A549 hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikülü ile 24 saat süre muamelesi sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri BK büyüme kontrol (**; $p<0,001$ BK ile karşılaştırılmıştır.)

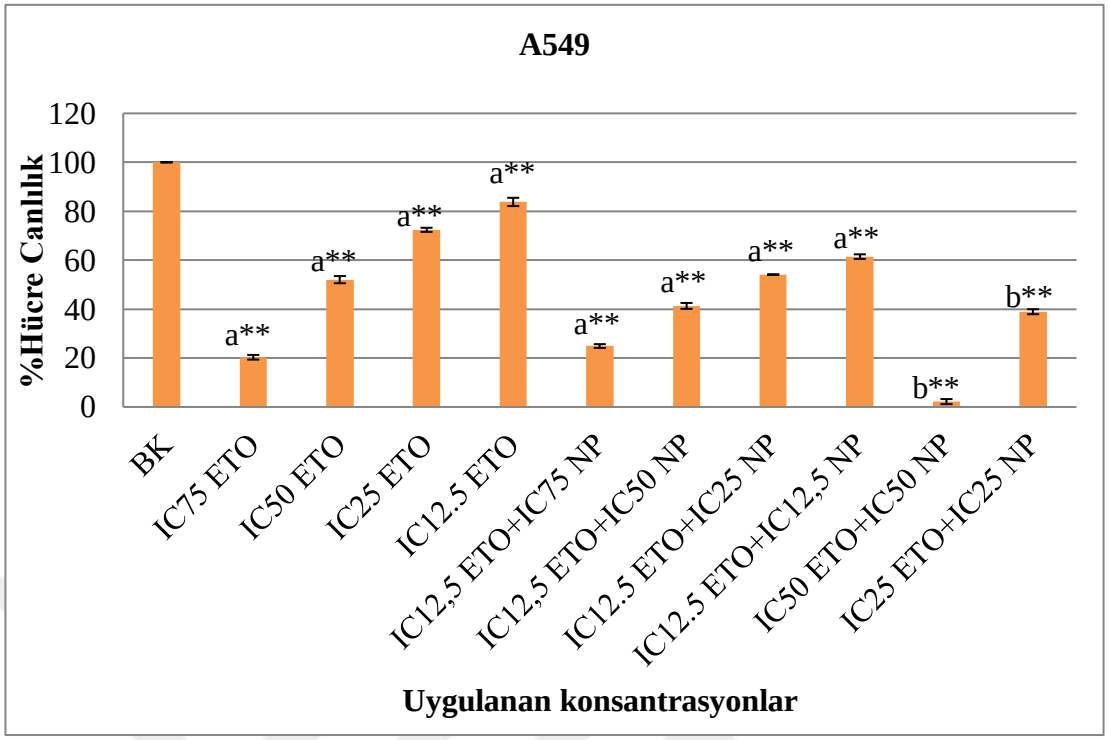
Çizelge 4.4. $Al(OH)_3$ nanopartikülünün A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında 24 saat süre sonunda elde edilen yüzde canlılık değerleri.

	A549	**BEAS 2B**
BK	100	100
2500 µg/mL	96**	90±4,24**
5000 µg/mL	81,5±10,60**	66,5±7,77**
7500 µg/mL	72,5±9,19**	57,5±2,12**
10000 µg/mL	51,52±1,079**	51,18±3,76**
12500 µg/mL	35,87±1,88**	32,39±8,57**
15000 µg/mL	26,43±0,40**	26,77±3,55**
17500 µg/mL	6,05±0,60**	4,58±0,62**

BK: Büyüme kontrol (**: $p<0,001$, BK ile karşılaştırıldığında)

4.2.2. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında $Al(OH)_3$ nanopartikülü ve Etoposid'in kombin dozları için elde edilen klonojenik test sonuçları

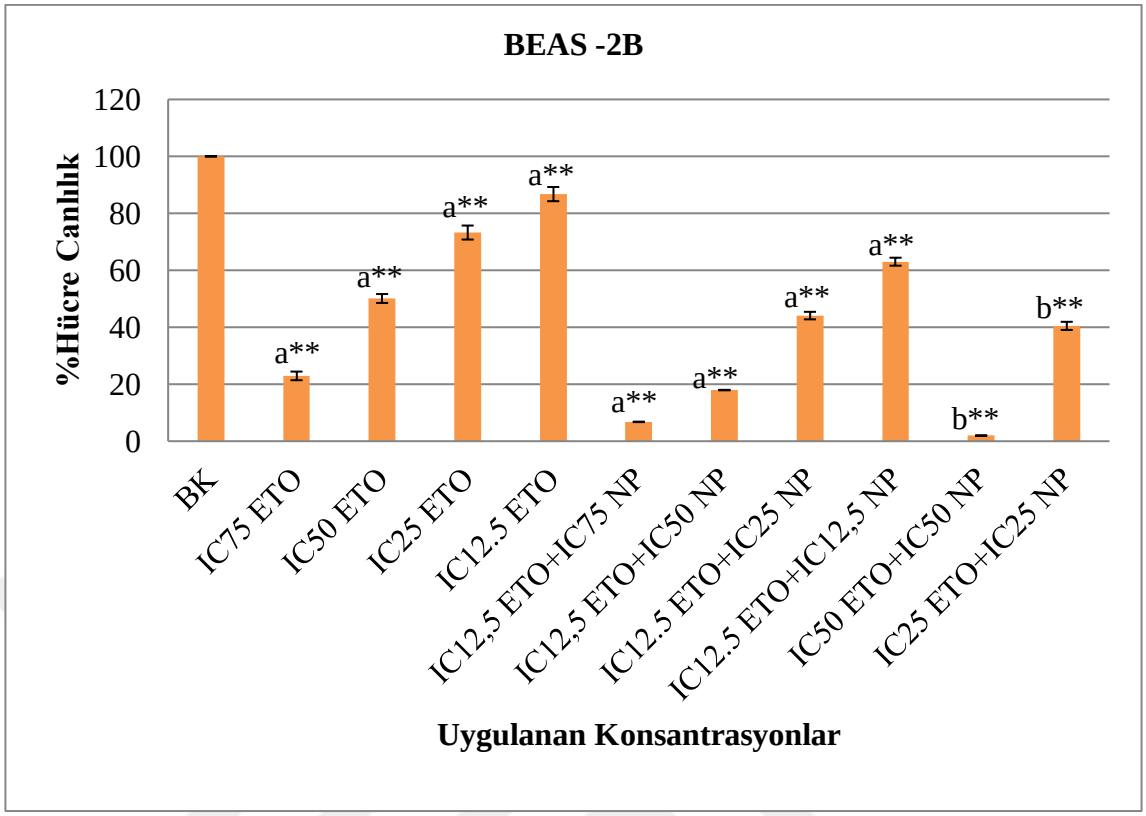
A549 hücre hattının $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat süre ile muamele edilmesi sonucu elde edilen veriler Şekil 4.9 ve Çizelge 4.5'te gösterilmiştir. $Al(OH)_3$ nanopartikülünün Etoposid'in kombin konsantrasyonlarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre canlılığı açısından kontrol grubu ile anlamlı farklılık bulunduğu One-way Anova ve Tamhane testi ile belirlenmiştir. Ayrıca Etoposid'in etkinliğinin $Al(OH)_3$ nanopartikülü ile arttığı ve bu etkinlik artışının istatistksel olarak anlamlı olduğu Tukey HSD testi ile belirlenmiştir ($p<0,001$).



Şekil 4.9. A549 hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri. BK; Büyüme kontrol, Eto; Etoposid (a kontrol grubu ile karşılaştırılması $p<0,001$**, b Etoposid'in aynı konsantrasyonu ile karşılaştırılması $p<0,001$**).

BEAS-2B hücre hattının $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin konsantrasyonları ile 24 saat süre muamele edilmesi sonucu elde edilen veriler Şekil 4.10 ve Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.

$Al(OH)_3$ nanopartikülünün Etoposid'in kombin konsantrasyonlarının hücre canlılık değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kontrol grubu ile anlamlı farklılık bulunduğu One-way Anova ve Tamhane testi ile belirlenmiştir. Ayrıca Etoposid'in etkinliğinin $Al(OH)_3$ nanopartikülü ile arttığı ve bu etkinlik artışının istatiksel olarak anlamlı olduğu Tukey HSD testi ile belirlenmiştir ($p<0,001$).



Şekil 4.10. BEAS-2B hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri. BK; Büyüme kontrol, Eto; Etoposid (a kontrol grubu ile karşılaştırılması p<0,001**, b Etoposid'in aynı konsantrasyonu ile karşılaştırılması p<0,001**).

Çizelge 4.5. A549 ve BEAS-2B hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen yüzde canlılık değerleri.

	A549	**BEAS-2B**
BK	100±0	100±0
IC_{75} ETO	20,32±0,94a**	22,92±1,51a**
IC_{50} ETO	52,03±1,46a**	50,10±1,56a**
IC_{25} ETO	72,409±0,83a**	73,26±2,45a**
$IC_{12.5}$ ETO	83,80±1,68a**	86,76±2,48a**
$IC_{12,5}$ ETO+IC_{75} NP	24,90±0,77a**	6,78±0,08a**
$IC_{12,5}$ ETO+IC_{50} NP	41,30±1,20a**	17,94±0,087a**
$IC_{12.5}$ ETO+IC_{25} NP	54,10±0,14a**	44,10±1,31a**
$IC_{12.5}$ ETO+$IC_{12,5}$ NP	61,45±0,93a**	63,02±1,39a**
IC_{50} ETO+IC_{50} NP	2,203±1,02b**	1,96±0,02b**
IC_{25} ETO+IC_{25} NP	38,93±1,01b**	40,49±1,42b**

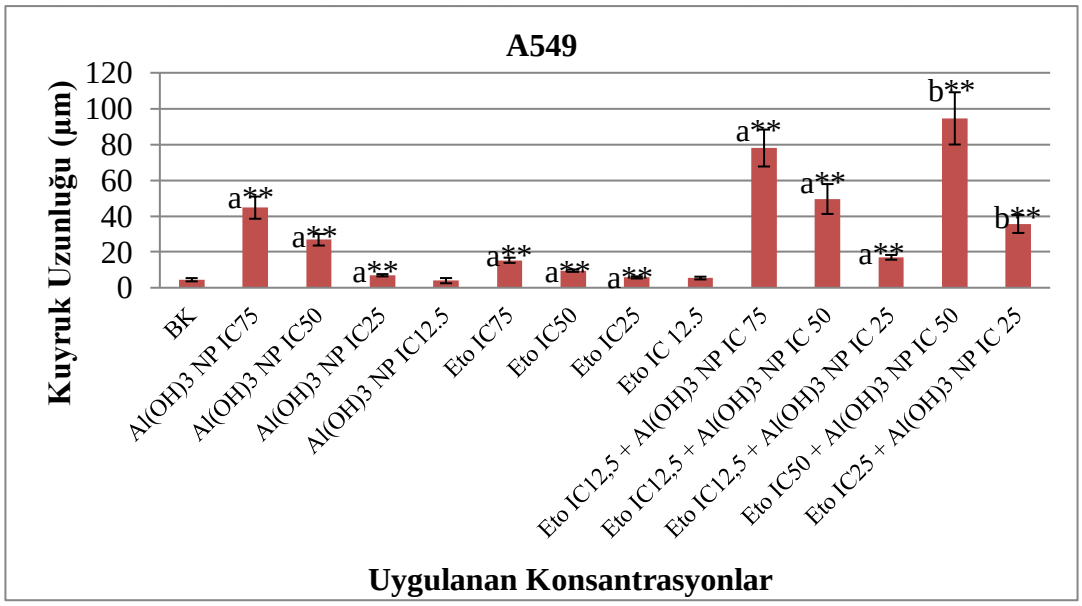
BK; Büyüme kontrol, Eto; Etoposid (a kontrol grubu ile karşılaştırılması $p<0,001$**, b etoposidin aynıdozu ile karşılaştırılması $p<0,001$

4.4. Komet Testi Bulguları

4.4.1. Kuyruk Uzunluğu Bulguları

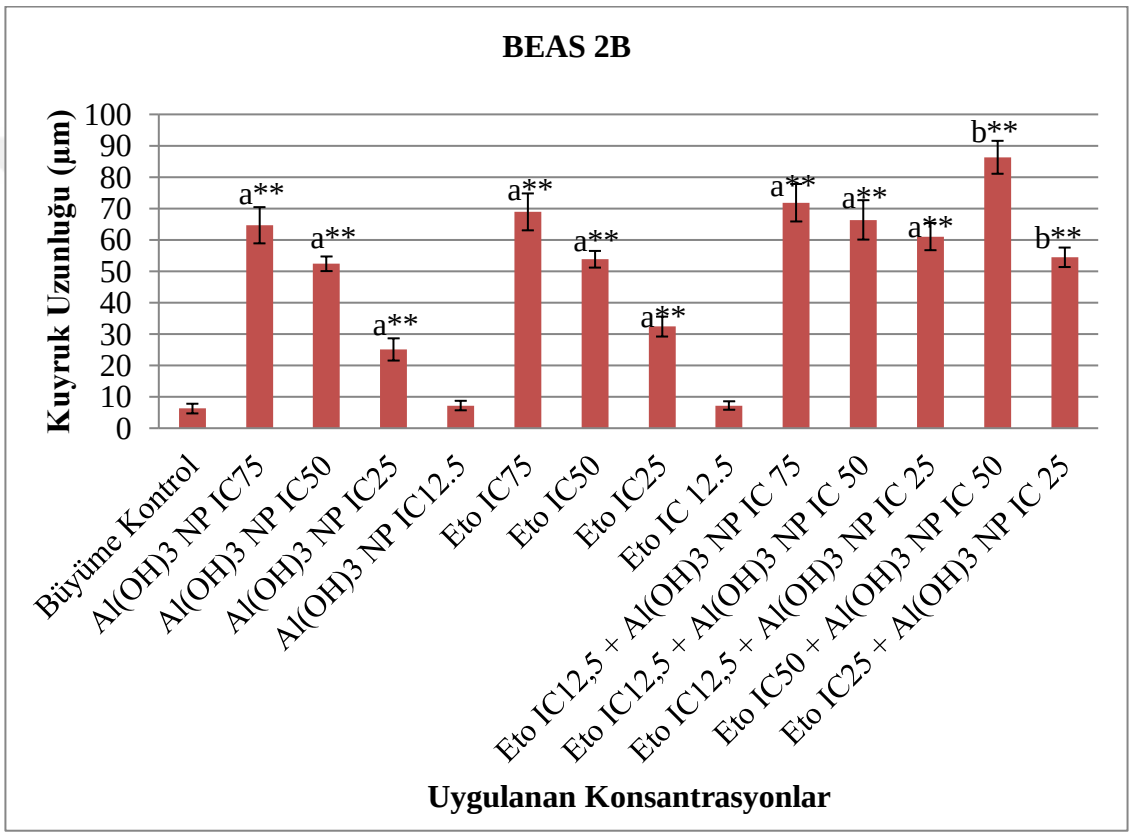
$Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in tek başlarına ve kombin konsantrasyonlarının A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında 24 saat süre ile muamele edilmesi sonucunda elde edilen kuyruk uzunluğu sonuçları Çizelge 4.4'de verilmiştir. Kuyruk uzunluğu verileri istatistiksel analizleri One-Way Anova ve Tukey HSD testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

A549 hücre hattında büyüme kontrol grubunda ortalama kuyruk uzunluğu 4,46 ± 0,92 µm olarak saptanmıştır. $Al(OH)_3$ nanopartikülü ile Etoposid'in $IC_{12,5}$ konsantrasyonlarında büyüme kontrolle kıyaslandığında anlamlı bir farklılığın olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Ayrıca Etoposid'in etkinliğinin nanopartiküllle birlikte verildiğinde arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu LSD test yöntemi ile belirlenmiştir. A549 hücre hattında elde edilen kuyruk uzunluğu verileri şekil 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. A549 hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri BK; Büyüme kontrol, Eto; Etoposid (a kontrol grubu ile karşılaştırılması $p<0,001$**, b Etoposid'in aynı konsantrasyonu ile karşılaştırılması $p<0,001$**).

BEAS-2B hücre hattında büyüme kontrol grubunda ortalama kuyruk uzunluğu 6,25 ± 1,54 µm olarak saptanmıştır. $Al(OH)_3$ nanopartikülü ile Etoposid'in $IC_{12,5}$ konsantrasyonlarının sonuçları büyüme kontrolle kıyaslandığında anlamlı bir farklılığın olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). Ayrıca Etoposit'in etkinliğinin nanopartiküllle birlikte verildiğinde arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu LSD test yöntemi ile belirlenmiştir. BEAS-2B hücre hattında elde edilen kuyruk uzunluğu verileri şekil 4.12'de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. BEAS-2B hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri. BK; Büyüme kontrol, Eto; Etoposid (a kontrol grubu ile karşılaştırılması p<0,001**, b Etoposid'in aynı konsantrasyonu ile karşılaştırılması p<0,001**).

Çizelge 4.6. A549 ve BEAS-2B hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen kuyruk uzunluk değerleri

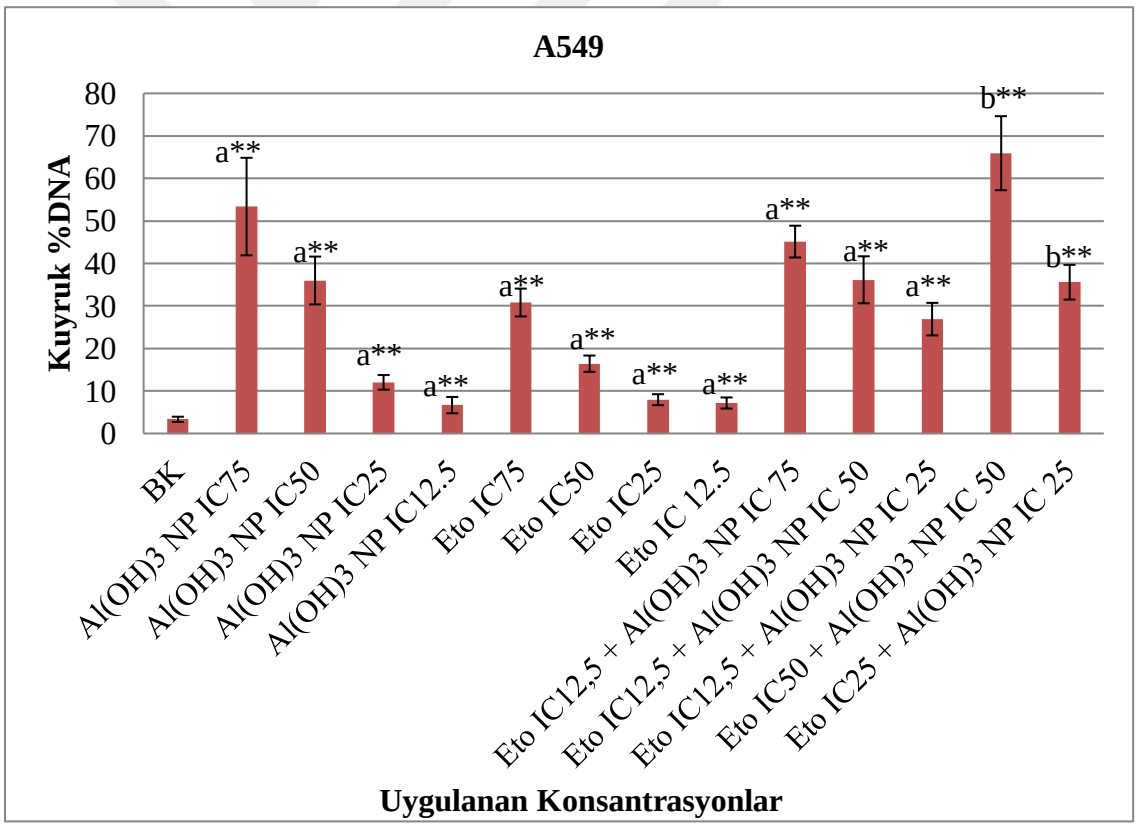
	A549	**BEAS-2B**
BK	4,46±0,92	6,25±1,54
IC_{75} ETO	44,70±6,19a**	64,67±5,77a**
IC_{50} ETO	26,79±3,25a**	52,39±2,33a**
IC_{25} ETO	6,95±0,64a**	25,09±3,541a**
$IC_{12.5}$ ETO	3,94±1,45a**	7,21±1,51a**
$IC_{12,5}$ ETO+IC_{75} NP	15,33±1,44a**	68,93±5,88a**
$IC_{12,5}$ ETO+IC_{50} NP	9,52±0,66a**	53,83±2,65a**
$IC_{12.5}$ ETO+IC_{25} NP	5,76±0,59a**	32,37±3,17a**
$IC_{12.5}$ ETO+$IC_{12,5}$ NP	5,39±0,77a**	7,22±1,34a**
IC_{50} ETO+IC_{50} NP	78,00±10,31b**	71,85±5,96b**
IC_{25} ETO+IC_{25} NP	49,54±8,33b**	66,38±6,27b**

BK; Büyüme kontrol, Eto; Etoposid(a kontrol grubu ile karşılaştırılması $p<0,001$**, b etoposidin aynıdozu ile karşılaştırılması $p<0,001$).

4.4.2. Kuyruk % DNA bulguları

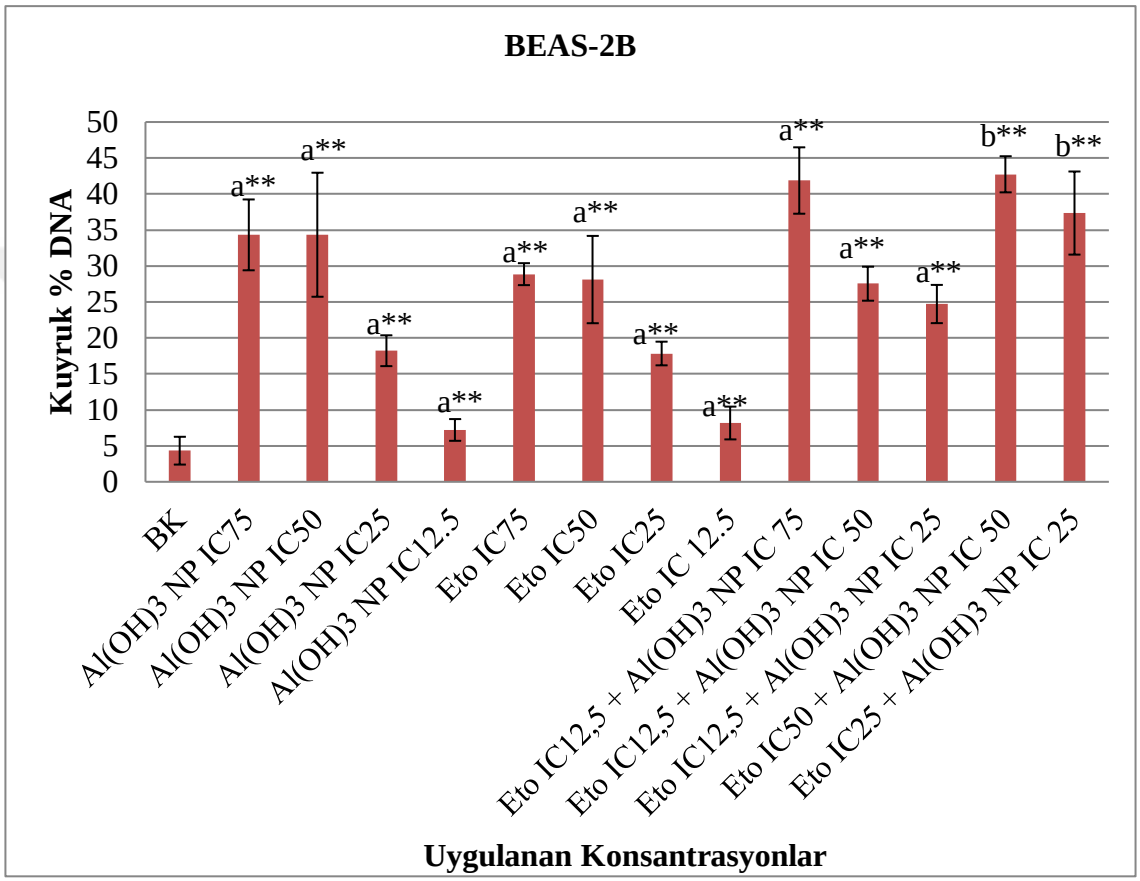
$Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in tek başlarına ve kombin konsantrasyonlarının A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında 24 saat süre ilemuamele edilmesi sonucunda elde edilen kuyruk % DNA sonuçları Çizelge 4.5'de verilmiştir. Kuyruk uzunluğu verileri istatistiksel analizleri One-Way Anova ve Tukey HSD testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

A549 hücre hattında büyüme kontrol grubunda ortalama kuyruk % DNA miktarı 3,33 ± 0,61 olarak saptanmıştır. Etoposid'in etkinliğinin nanopartiküllle birlikte verildiğinde arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu LSD test yöntemi ile belirlenmiştir. A549 hücre hattında elde edilen % DNA verileri Şekil 4.13'de gösterilmiştir.



Şekil 4.13. A549 hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen kuyruk % DNA değerleri. BK; Büyüme kontrol, Eto; Etoposid (a kontrol grubu ile karşılaştırılması $p<0,001$**, b Etoposid'in aynı konsantrasyonu ile karşılaştırılması $p<0,001$**).

BEAS-2B hücre hattında büyüme kontrol grubunda ortalama kuyruk % DNA miktarı 4,32 ± 1,93 olarak saptanmıştır. Etoposid'in etkinliğinin nanopartiküllle birlikte verildiğinde arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu LSD test yöntemi ile belirlenmiştir. A549 hücre hattında elde edilen % DNA verileri Şekil 4.14'de gösterilmiştir.



Şekil 4.14. BEAS-2B hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen kuyruk % DNA değerleri. BK; Büyüme kontrol, Eto; Etoposid (a kontrol grubu ile karşılaştırılması $p<0,001$**, b Etoposid'in aynı konsantrasyonu ile karşılaştırılması $p<0,001$**).

Çizelge 4.7. A549 ve BEAS-2B hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen kuyruk % DNA değerleri.

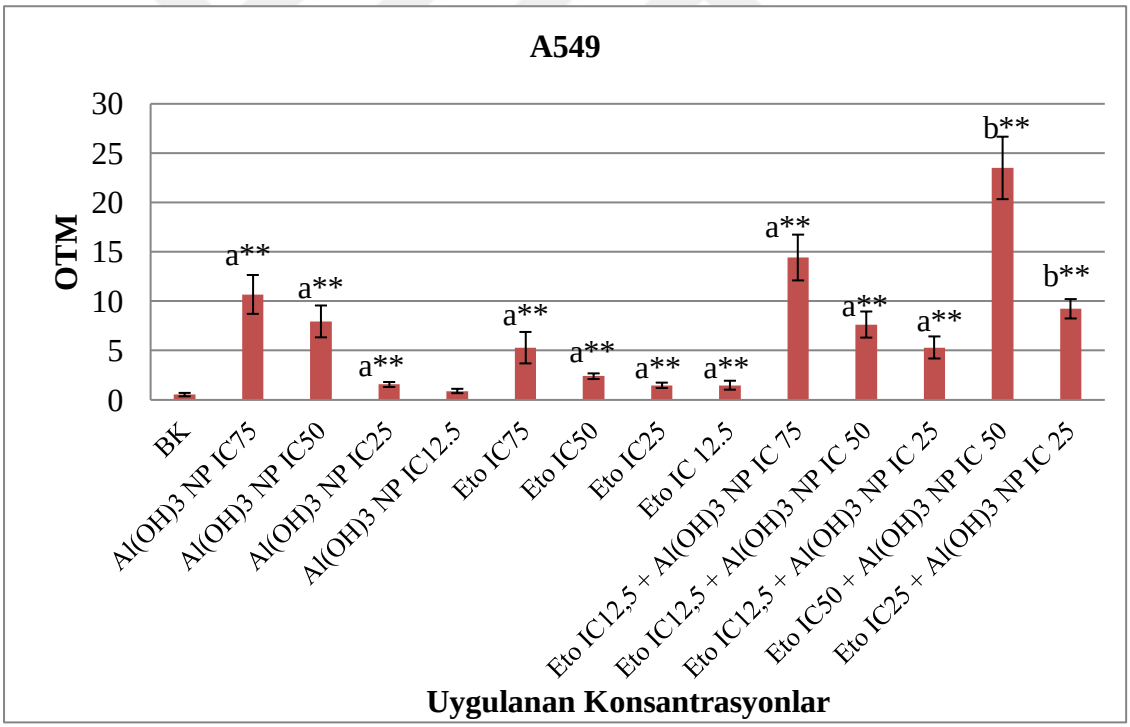
	A549	**BEAS-2B**
BK	3,33±0,61	4,32±1,93
IC_{75} ETO	53,37±11,47a**	34,31±4,92a**
IC_{50} ETO	35,99±5,62a**	34,33±8,61a**
IC_{25} ETO	12,02±1,72a**	18,21±2,14a**
$IC_{12.5}$ ETO	6,67±1,91a**	7,20±1,51a**
$IC_{12,5}$ ETO+IC_{75} NP	30,80±3,27a**	28,85±1,52a**
$IC_{12,5}$ ETO+IC_{50} NP	16,41±1,91a**	28,10±6,06a**
$IC_{12.5}$ ETO+IC_{25} NP	7,94±1,29a**	17,83±1,64a**
$IC_{12.5}$ ETO+$IC_{12,5}$ NP	7,17±1,30a**	8,17±2,27a**
IC_{50} ETO+IC_{50} NP	45,14±3,73b**	41,86±4,61b**
IC_{25} ETO+IC_{25} NP	36,15±5,53b**	27,53±2,36b**

BK; Büyüme kontrol, Eto; Etoposid (a kontrol grubu ile karşılaştırılması $p<0,001$**, b etoposidin aynıdozu ile karşılaştırılması $p<0,001$).

4.4.3. Kuyruk OTM bulguları

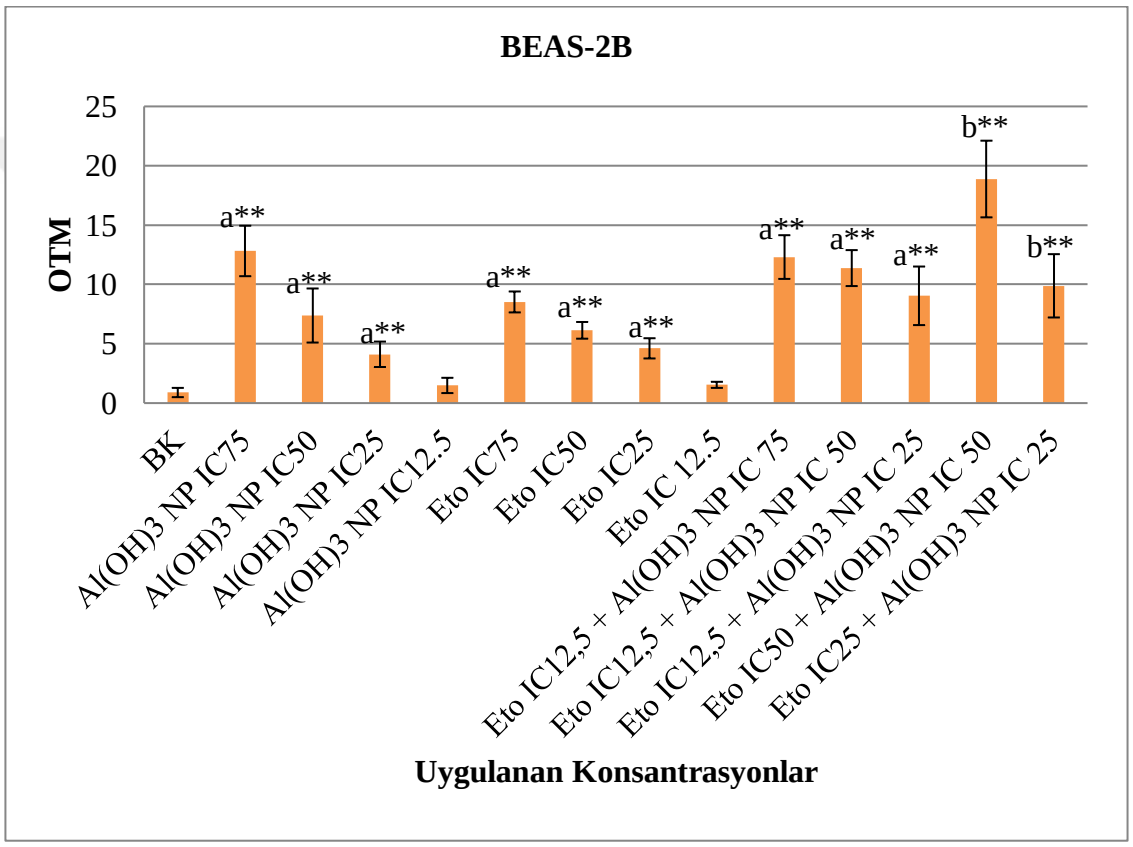
$Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in tek başlarına ve kombin dozlarının A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında 24 saat muamele edilmesi sonucunda elde edilen kuyruk OTM sonuçları Çizelge 4.6'de verilmiştir. Kuyruk uzunluğu verileri istatistiksel analizleri One-Way Anova ve Tukey HSD testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

A549 hücre hattında büyüme kontrol grubunda OTM değeri 0,53 ± 0,17 olarak belirlenmiştir. $Al(OH)_3$ nanopartikülünün $IC_{12,5}$ konsantrasyonu büyüme kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı kabul edilebilecek bir farklılığın olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). Etoposid'in etkinliğinin nanopartiküllle birlikte verildiğinde arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu LSD test yöntemi ile belirlenmiştir. A549 hücre hattında elde edilen OTM verileri şekil 4.15'de gösterilmiştir.



Şekil 4.15. A549 hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen kuyruk OTM değerleri. BK; Büyüme kontrol, Eto; Etoposid (a kontrol grubu ile karşılaştırılması $p<0,001$**, b Etoposid'in aynı konsantrasyonu ile karşılaştırılması $p<0,001$**).

BEAS-2B hücre hattında büyüme kontrol grubunda ortalama OTM değeri 0,89 ± 0,39 olarak saptanmıştır. $Al(OH)_3$ nanopartikülü ve Etoposid'in $IC_{12,5}$ konsantrasyonlarının OTM değerleri büyüme kontrolle kıyaslandığında anlamlı bir farklılığın olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). Etoposid'in etkinliğinin nanopartiküllе birlikte verildiğinde arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu LSD test yöntemi ile belirlenmiştir. BEAS-2B hücre hattında elde edilen OTM verileri şekil 4.16'de gösterilmiştir.



Şekil 4.16. BEAS-2B hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen kuyruk OTM değerleri.BK; Büyüme kontrol, Eto; Etoposid (a kontrol grubu ile karşılaştırılması $p<0,001$**, b Etoposid'in aynı konsantrasyonu ile karşılaştırılması $p<0,001$**).

Çizelge 4.8. A549 ve BEAS-2B hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 24 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen kuyruk OTM değerleri.

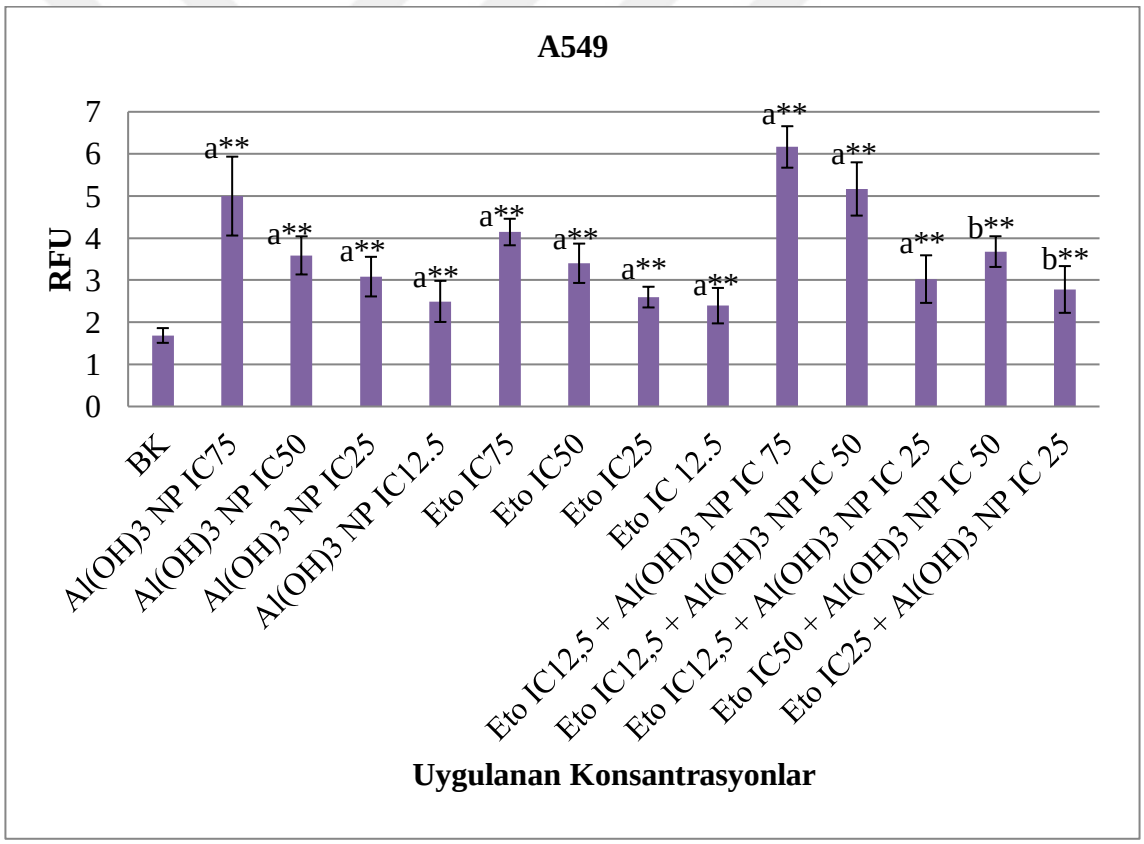
	A549	**BEAS-2B**
BK	0,53±0,17	0,89±0,39
IC_{75} ETO	10,68±1,96a**	12,82±2,12a**
IC_{50} ETO	7,95±1,61a**	7,37±2,27a**
IC_{25} ETO	1,561±0,25a**	4,11±1,07a**
$IC_{12.5}$ ETO	0,90±0,22	1,48±0,64
$IC_{12,5}$ ETO+IC_{75} NP	5,29±1,59a**	8,52±0,88a**
$IC_{12,5}$ ETO+IC_{50} NP	2,40±0,28a**	6,13±0,70a**
$IC_{12.5}$ ETO+IC_{25} NP	1,47±0,27a**	4,61±0,85a**
$IC_{12.5}$ ETO+$IC_{12,5}$ NP	1,49±0,45a**	1,53±0,25a**
IC_{50} ETO+IC_{50} NP	14,42±2,31b**	12,30±1,84b**
IC_{25} ETO+IC_{25} NP	7,63±1,32b**	11,37±1,51b**

BK; Büyüme kontrol, Eto; Etoposid(a kontrol grubu ile karşılaştırılması $p<0,001$**, b etoposidin aynıdozu ile karşılaştırılması $p<0,001$)

4.5. ROS Testi Bulguları

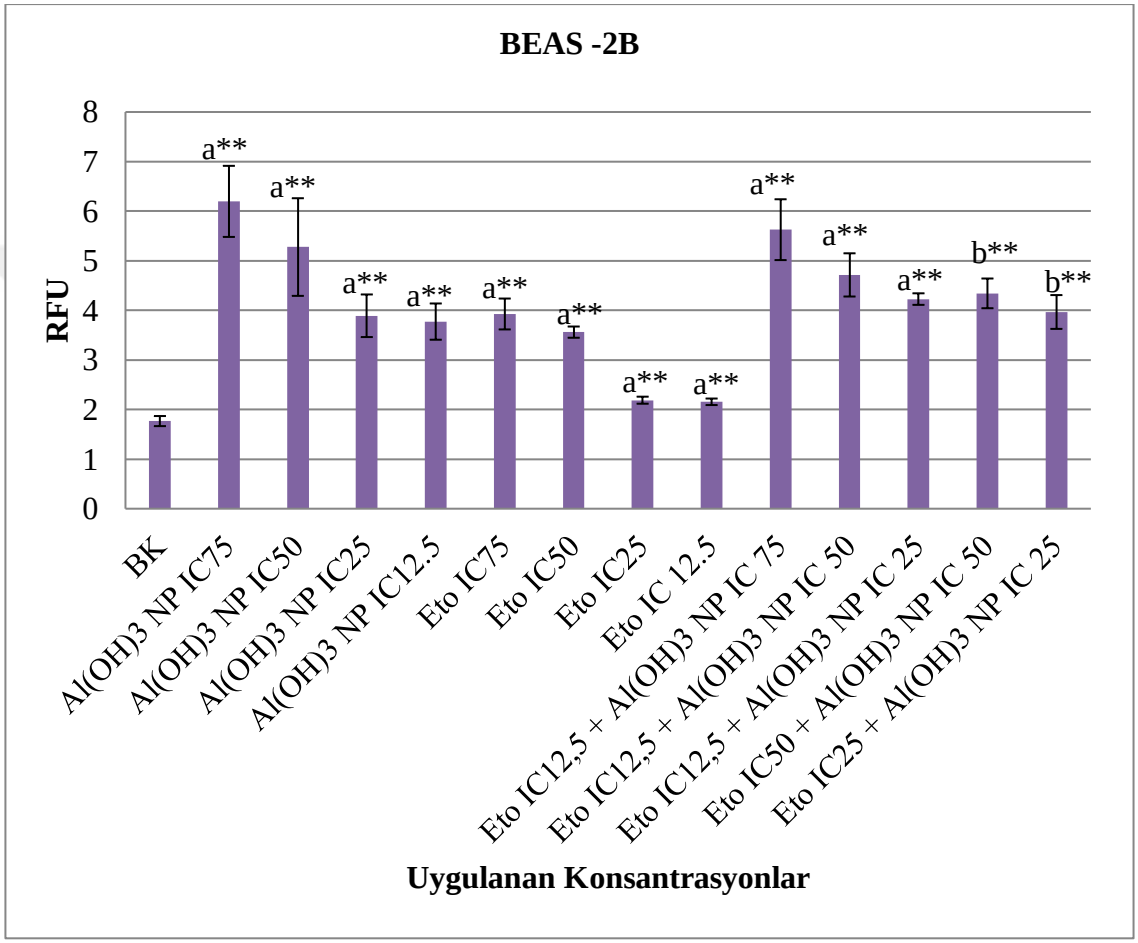
$Al(OH)_3$ nanopartikülü ve Etoposid'in tek başlarına ve kombin konsantrasyonlarının A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında 4 saat sonraki hücre içi ROS seviyeleri ortalama RFU değeri olarak ölçülmüş ve Çizelge 4.7'de verilmiştir. ROS verileri istatistiksel analizleri One-Way Anova ve Tukey HSD testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

A549 hücre hattında büyüme kontrol grubunda ortalama RFU değerleri 1,68 ± 0,17 olarak saptanmıştır. Etoposid'in etkinliğinin nanopartiküllle birlikte verildiğinde arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu LSD test yöntemi ile gösterilmiştir. A549 hücre hattında elde edilen ROS verileri şekil 4.17'de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. A549 hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikül ve Etoposid'in kombin dozları ile 4 saat süre ile muamelesi sonucunda elde edilen kuyruk ROS değerleri. BK; Büyüme kontrol, Eto; Etoposid (a kontrol grubu ile karşılaştırılması $p<0,001$**, b Etoposid'in aynı konsantrasyonu ile karşılaştırılması $p<0,001$**).

BEAS-2B hücre hattında büyüme kontrol grubunda ortalama RFU değerleri 1,76 ± 0,10 olarak saptanmıştır. Etoposid'in etkinliğinin nanopartiküllle birlikte verildiğinde arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı kabul edildiği LSD test yöntemi ile gösterilmiştir. BEAS-2B hücre hattında elde edilen ROS verileri Şekil 4.18'de gösterilmiştir.



Şekil 4.18. BEAS-2B hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikülü ve Etoposid'in kombin dozları ile 4 saat süre muamelesi sonucunda elde edilen kuyruk ROS değerleri. BK; Büyüme kontrol, Eto; Etoposid (a kontrol grubu ile karşılaştırılması p<0,001**, b Etoposid'in aynı konsantrasyonu ile karşılaştırılması p<0,001**).

Çizelge 4.9. A549 ve BEAS-2B hücre hattında $Al(OH)_3$ nanopartikülü ve Etoposid'in kombin dozları ile 4 saat muamelesi sonucunda elde edilen ROS değerleri.

	A549	**BEAS-2B**
BK	1,68±0,17	1,76±0,10
IC_{75} ETO	4,99±0,93a**	6,19±0,71a**
IC_{50} ETO	3,58±0,45a**	5,27±0,98a**
IC_{25} ETO	3,08±0,47a**	3,89±0,42a**
$IC_{12.5}$ ETO	2,49±0,48a**	3,77±0,36a**
$IC_{12,5}$ ETO+IC_{75} NP	4,14±0,31a**	3,92±0,31a**
$IC_{12,5}$ ETO+IC_{50} NP	3,40±0,46a**	3,56±0,11a**
$IC_{12.5}$ ETO+IC_{25} NP	2,59±0,24a**	2,18±0,07a**
$IC_{12.5}$ ETO+$IC_{12,5}$ NP	2,39±0,42a**	2,15±0,06a**
IC_{50} ETO+IC_{50} NP	6,16±0,49b**	5,62±0,61b**
IC_{25} ETO+IC_{25} NP	5,16±0,63b**	4,71±0,43b**

BK; Büyüme kontrol, Eto; Etoposid(a kontrol grubu ile karşılaştırılması $p<0,001$**, b etoposidin aynıdozu ile karşılaştırılması $p<0,001$

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser tanılarının son yıllarda giderek artması ve kanser tedavisinde kullanılan yöntemlerin birçok yan etkiye sebep olması kanser tedavisinde doğal yollardan elde edilen anti kanser ilaçların geliştirilmesine yönelik çalışmalara hız kazandırmıştır. Bu anlamda birçok nanopartikül, antikanser araştırmalarda kullanılmaktadır. Özellikle de metal nanopartikülleri bu anlamda sıklıkla kullanılmakta, deneysel çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır.

Nanomateryali tanımlayacak olursak, en az bir boyutu 1-100 nm aralığında olan materyalleri tanımlamak için kullanılmaktadır. Nanomateryallerin içerisinde nanopartiküller, nanotüpler, nanofiberler ve nanokompozitler yer almaktadır (Borm ve ark., 2006).

Nanoteknoloji, nanometre boyutlarında malzeme tasarlanması ve üretmeyi, bu malzemelerden yeni yöntemlerle belirlenmiş amaçlara yönelik aletler ve aygıtlar üretmeyi amaçlamaktadır (Çıracı, 2005).

Nanomateryallerin önemli bir kısmını oluşturan nanopartiküller 0,1-100 nm boyutlara sahip olan parçacıklardır. Nanopartiküller amorf, kristalin, sferik, iğneli vs. şekillerde olabilirler ve 1-100 atom ya da molekülden oluşurlar (Buzea ve ark., 2007).

Moleküler ve atomik ölçeklerdekinanomateryal sistemlerinin, küçük yapıları nedeniyle yeni özellikler sergileyebilme potansiyelleri göz önüne alındığında, yenilikçi moleküler tasarımların, yüksek derecede çok yönlülükle birlikte oluşturulabileceği ön görülmektedir (Bhattacharyya ve ark., 2011; Arvizo ve ark., 2012).

Akhtar ve arkadaşlarının (2015), metal nanopartülleri ile ilgili yapmış oldukları çalışmada MCF-7 hücreleri, 24 saat boyunca 25, 50 ve 100 µg / mL konsantrasyonlarda saf ve Al katkılı ZnO nanopartiküllerine maruz bırakılmış ve sitotoksisite, MTT, NRU ve LDH testleri ile belirlenmiştir.

Her üç test de, Al katkılı ZnO nanopartiküllerinin sitotoksik yanıtının, saf ZnO nanopartiküllerine kıyasla daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Saf ZnO nanopartikül maruziyetine bağlı, MTT hücre canlılığı % 80, %46 ve %31'e düşürülürken, Al katkılı ZnO nanopartiküllere bağlı, hücre canlılığı azalması 25, 50, 100 mg konsantrasyonlarda % 67, % 33 ve % 22 olarak belirlenmiştir. MTT testi ile IC_{50} değerleri, saf ZnO nanopartiküller için 44 µg / ml ve Al katkılı ZnO nanopartiküller için 31 µg / ml olarak hesaplanmıştır. NRU sonuçlarında da benzer hücre canlılığı eğilimleri gözlenmiştir (Akhtar ve ark, 2015).

Khashan ve arkadaşlarının (2020), alüminyum katkılı çinko oksit nanopartikülleri ile ilgili yapmış oldukları çalışmada deiyonize suda lazer ablasyon yoluyla çinko oksit nanopartiküller (ZnO NP'ler) ve alüminyum katkılı ZnO nanopartiküller (Al ZnO NP'ler) üretmiştir. Sentezlenen nanopartiküller, X-ışını kırınımı (XRD), UV-Vis spektroskopisi, alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (FESEM) ve enerji dağıtıcı spektrum (EDS) analizleri ile karakterize edilmiştir. ZnO NP'ler, küçük aglomere küresel nanopartiküllerin varlığıyla birlikte, nanoplattannanotele şekli değişirken, lazer darbelerinin sayısındaki artışla partikül boyutunun arttığı gösterilmiştir. Antibakteriyel aktivite testinde kullanılan bu nanopartiküllerden Al ZnO'nun daha yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Çalışmada ayrıca, ilgili nanopartiküllerin, MDA-MB-231 hücrelerinde antikanser aktivite gösterdiği de belirlenmiştir. Araştırmacılar, kanser hücrelerinin nanopartiküller tarafından hücre ölümünün indüksiyonu yoluyla hedeflendiğini belirtmişlerdir. Araştırıcılar, sonuç olarak hazırlanan partiküllerin, meme kanseri terapisi için anti-kanser ilaçlarının geliştirilmesinde faydalı olacağını düşündüklerini belirtmişlerdir (Khashan ve ark., 2020).

Lin ve arkadaşları (2008), yapmış olduğu çalışmada 13 ve 22 nm, alüminyum oksit (Al_2O_3), 20 nm CeO_2 ve 2 ve 40 nm TiO_2 nanopartiküllerin, insan akciğer kanser hücrelerindeki (A549) sitotoksisitesini incelenmiştir. Her iki Al_2O_3 nanopartikülüne de 24 saat boyunca 10 ve 25 µg mL- 1 konsantrasyonlarınamaruz kalma durumunda, kontrole grubuna kıyasla hücre canlılığını önemli ölçüde azaltmıştır.

Çalışmada Al_2O_3 nanopartikülünün sitotoksisitesinin, TiO_2 nanopartikülünden daha yüksek ancak CeO_2 nanopartiküllerinden daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, çalışmada en toksik olan 20 nm CeO_2 parçacıklarının, hem 13 hem de 22 nm boyutlarındaki Al_2O_3'ten daha az depolarizasyona neden olduğu belirtilmiştir. Maruz kalma süresi, yüzey kimyası ve diğer mekanizmalar gibi faktörlerin, sitotoksisite ve membran depolarizasyonu arasında farklı şekilde katkıda bulunabileceğini vurgulamışlardır (Lin ve ark., 2008).

Lerner ve arkadaşları (2018), AlOOH (Alüminyum hidroksit) nanomateryalini sentezleyerek yapmış oldukları çalışmada AlOOH (Alüminyum hidroksit) nanomateryalinin benzersiz özellikleri ile tümör hücresi büyümesini inhibe etmek için kullanmışlardır. Üç insan kanser hücre hattı (MCF-7, UM-SCC-14C ve HeLa) ve birincil fare meme tümörü (PyMT) hücreleri, 5 mg ml^{-1} AlOOH ile 24 saat süre ile muamele edilmiştir. Süre sonunda tümör hücre canlılığında önemli bir azalma gözlemlemişlerdir. Daha sonra, AlOOH'in tümör hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini araştırmak için BrdU (5-bromo-2′-deoksiüridin) deneyi kullanmışlardır. Test edilen tüm hücre hatlarının çoğalmasında % 30-37'lik bir azalma gözlemlenmiştir (Lerner ve ark., 2018).

Sun ve arkadaşları (2010), tarafından $Al(OH)_3$ nanopartikülünün (AlNp), immunterapi amaçlı kullanılan kanser aşılarının üzerindeki etkinliği araştırmışlar ve AlNp ve TCV (Tumor Cell Vacine)'nin kombinasyonel tedavisini alan hayvanlarda ortalama tümör boyutunun daha düşük olduğu rapor edilmiştir (Sun ve ark., 2010).

Nanopartikülerin sahip oldukları birçok özelliğin kanser tedavilerinde kullanılması bu alanda araştırmaların genişlemesine ve günümüzde kullanılan antikanser ilaçlarla birlikte etkilerinin araştırılmasının önünü açmıştır.

Literatür özetinde de sunulduğu gibi farklı Al içerikli nanopartiküllerin değişik hücre hatları üzerinde denemiş antikanser çalışmaları olumlu sonuçlar vermiştir.

Bu tez çalışmasında XTT testi ile A549 hücre hattının $Al(OH)_3$ nanopartikül ile 24 saat muamele edilmesi sonucunda $Al(OH)_3$ nanopartikülünün A549 hücre hattındaki IC_{50} değerleri 9657,179 ± 354,42 µg/mL, olarak hesaplanmıştır. $Al(OH)_3$ nanopartikülünün BEAS-2B hücre hattındaki IC_{50} değerleri ise 9758 ± 138,42 µg/mL olarak hesaplanmıştır. XTT sonucunda elde edilen IC_{50} değerleri açısından BEAS-2B ve A549 hücre hatları arasında istatistikî olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$). Sonuç olarak XTT testi ile belirlenen IC_{50} değerleri açısından $Al(OH)_3$ nanopartikülleri BEAS-2B ve A549 hücre hatlarının sağlıklı ve kanserli hücreler üzerinde hücre canlılığı açısından anlamlı bir farklılık göstermemiştir.

Bununla birlikte, Etoposid'in tek başına A549 hücre hattında IC_{50} konsantrasyonu olan 564,6 ± 17,9 µM ile birlikte $Al(OH)_3$ NP nin IC_{50} konsantrasyonlarının beraber uygulandığı hücrelerde % hücre canlılığının 3,96 ± 0,41' e gerilediği belirlenmiştir.

Benzer uygulama ile Beas-2B hücrelerinde % hücre canlılığının 8,807 ± 1,30'a gerilediği belirlenmiştir. Bu sonuçlarda da görüldüğü gibi Etoposid'in etkinliği $Al(OH)_3$ nanopartikülü ile birlikte verildiğinde istatiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır. ($p<0,001$).

Çalışmada uygulanan sitotoksisite testlerinden biri de klonojenik test yöntemidir. Bu çalışmadaki klonojenik test verileri incelendiğinde $Al(OH)_3$ nanopartikülünün A549 hücre hattında IC_{50} değeri 10165,1 ± 519,64 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

Klonojenik test deney sonuçlarında nanopartikül konsantrasyonununartmasına paralel olarak büyüme kontrolle kıyaslandığında hücre canlılığında istatiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$).

BEAS-2B hücre hattında ise $Al(OH)_3$ nanopartikülünün IC_{50} değerleri 9440,89 ± 201,45 µg/mL, olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde nanopartikül konsantrasyonunun artması hücre canlılığını büyüme kontrol grubuna kıyasla istatiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır ($p<0,001$).

$Al(OH)_3$ nanopartikülünün Etoposid'in kombin uygulamalarının kontrol grubu ile karşılaşırıldığında anlamlı farklılık bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca Etoposid'in, $Al(OH)_3$ nanopartikülü ile birlikte kullanılmasının Etoposid'in etkinliğini istatiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı da belirlenmiştir. ($p<0,001$).

Elde ettiğimiz sitotoksite bulguları yukarıda değinilen diğer çalışmalarda olduğu gibi $Al(OH)_3$ nanopartiküllerinin A549 ve BEAS-2B hücrelerinde antiproliferatif etkinliğe sahip olduğunu destekler niteliktedir. Ayrıca literatür taramasında benzer çalışmaya rastlanmamakla birlikte, $Al(OH)_3$ nanopartiküllerinin Etoposid ile birlikte uygulanmasının Etoposit'in sitotoksik etkinliğini de arttırma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.

Metal nanopartiküllerin sitotoksik etkileri yanında genotoksik etkiye sahip olabileceğini gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Papagerogiou ve arkadaşları (2007), 29,5 nm boyutundaki kobalt-krom alaşımı nanopartikülleri ile muamele edilen insan dermal fibroblast hücrelerinde DNA çift zincir kırıklarının, 8 hidroksi guanozin (8-Oh-dG) ürünlerinin ve kullanılan nanopartikül konsantrasyonunaparalel olarak mikronükleusfrekansının arttığını belirtmişlerdir. Krom-kobalt nanopartikülleri ile muamele edilen insan fibroblast hücrelerinde de bu nanopartiküllerin sitotoksik etkiye sahip olduğu ve bu hücrelerde kromozom hasarı meydana getirdiği rapor edilmiştir (Papagerogiou ve ark., 2007).

Parry ve arkadaşları (2010), comet ve floresan in situ hibridizasyon (FISH) teknikleri ile 29,5 nm ve 2,9 μm çapındaki kobalt-krom nanopartiküllerinin insan deri fibroblast hücrelerinde DNA zincir kırıklarını, kromozom anormalliklerini ve tetraploidiyi artırdığını belirlemişlerdir (Parry ve ark., 2010).

Tsaousi arkadaşları (2010), mikronükleus ve floresan in situ hibridizasyon (FISH) tekniklerini kullanarak 560 nm'den daha büyük kobalt-krom nanopartiküllerinin insan fibroblast hücrelerinde DNA zincir kırıkları, anöploidi ve erken kardeş kromatit ayrılması olaylarını artırdığını, kromozom kaybı ve kazancına yol açtığını vurgulamışlardır (Tsaousi ark., 2010).

Bu çalışmada kullanılan genotoksisite test yöntemlerinden Komet testi sonuçlarına bakıldığında, A549 hücre hattında büyüme kontrol grubunda kuyruk uzunluğu 4,46 ± 0,92 µm olarak saptanmıştır. $Al(OH)_3$ nanopartikülü ile Etoposid'in $IC_{12,5}$ dozlarında büyüme kontrolle kıyaslandığında anlamlı bir farklılığın olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). Ayrıca Etoposid'in etkinliği nanopartiküllle birlikte verildiğinde arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,001$).

BEAS-2B hücre hattında büyüme kontrol grubunda kuyruk uzunluğu 6,25 ± 1,54µm olarak saptanmıştır. $Al(OH)_3$ nanopartikülü ile Etoposid'in $IC_{12,5}$ dozlarında büyüme kontrolle kıyaslandığında anlamlı bir farklılığın olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). Ayrıca Etoposid'in etkinliğinin $Al(OH)_3$ nanopartiküllle birlikte verildiğinde arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,001$).

A549 hücre hattında büyüme kontrol grubunda % DNA 3,33 ± 0,61 olarak saptanmıştır. Etoposid'in etkinliği nanopartiküllle birlikte verildiğinde arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,001$).

BEAS-2B hücre hattında büyüme kontrol grubunda % DNA 4,32 ± 1,93 olarak saptanmıştır. Etoposid'in etkinliğinin nanopartiküllle birlikte verildiğinde arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,001$).

$Al(OH)_3$ nanopartikülü ve Etoposid kombine olarak $IC_{12,5}$ ETO+IC_{50} NP dozları ile muamele edildiğinde A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında % DNA miktarı sırasıyla 16,41 ± 1,91 ve 28,10 ± 6,06 olarak ölçülmüştür. Etoposid'in aynı dozları ile karşılaştığında $Al(OH)_3$ nanopartikülünün Etoposid'in etkinliğini arttırdığı istatistik olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,001$).

A549 hücre hattında büyüme kontrol grubunda OTM 0,53 ± 0,17 olarak saptanmıştır. $Al(OH)_3$ nanopartikülü $IC_{12,5}$ dozunun büyüme kontrolle kıyaslandığında anlamlı bir farklılığın olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$).

Etoposid'in etkinliğinin $Al(OH)_3$ nanopartikülü ile birlikte verildiğinde arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu olduğu görülmüştür ($p<0,001$).

BEAS-2B hücre hattında büyüme kontrol grubunda OTM 0,89 ± 0,39 olarak saptanmıştır. $Al(OH)_3$ nanopartikülü ve Etoposid'in $IC_{12,5}$ dozlarının büyüme kontrolle kıyaslandığında anlamlı bir farklılığın olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). Etoposid'in $Al(OH)_3$ nanopartikülü ile birlikte verildiğinde Etoposid'in etkinliğinin arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu olduğu görülmüştür ($p<0,001$).

$Al(OH)_3$ nanopartikülü ve Etoposid kombine olarak IC_{50} ETO+IC_{50} NP dozları ile muamele edildiğinde A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında OTM değeri sırasıyla 14,42 ± 2,31 ve 12,30 ± 1,84 olarak ölçülmüştür. Etoposid'in aynı dozları ile karşılaştırıldığında $Al(OH)_3$ nanopartikülünün Etoposid'in etkinliğini arttırdığı ve bu artışın istatistik olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,001$).

Yapılan başka bir çalışmada, karaciğer ve böbrek dokularında $Al(OH)_3$'ün neden olduğu apoptozu, miyositlerde nekrozu ve akciğer sisteminde ciddi hasarı ortaya çıkarmıştır. Bu çalışmaya göre hücre ölümü, nanotoksisitenin neden olduğu ROS'a bağlanmaktadır.
Ayrıca, $Al(OH)_3$ kaynaklı mitokondri, insan mezenkimal kök hücrelerinde oksidatif stres ve sitotoksisiteyi indüklemiştir (Patil ve ark., 2015; Bustani ve ark., 2021;, Baiee ve ark., 2020; Love ve ark., 2012).

A549 hücre hattında büyüme kontrol grubunda hücre içi ROS miktarını yansıtan RFU değerleri 1,68 ± 0,17 olarak saptanmıştır. Etoposid'in etkinliğinin nanopartiküller birlikte verildiğinde arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,001$).

BEAS-2B hücre hattında büyüme kontrol grubunda hücre içi ROS miktarını yansıtan RFU değerleri 1,76 ± 0,10 olarak saptanmıştır. Etoposid'in etkinliği nanopartiküller birlikte verildiğinde arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,001$).

$Al(OH)_3$ nanopartikülü ve Etoposid kombine olarak $IC_{12,5}$ ETO+IC_{50} NP dozları ile muamele edildiğinde A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında hücre içi ROS miktarını yansıtan RFU değerleri sırasıyla 3,40 ± 0,46 ve 3,56 ± 0,11 olarak ölçülmüştür. Etoposid'in aynı dozları ile karşılaştığında $Al(OH)_3$ nanopartikülünün Etoposid'in etkinliğini arttırdığı istatistik olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,001$).

Yapılan tüm çalışmalar sonucunda $Al(OH)_3$ nanopartikülünün (AlNp) sitotoksik etkisinin yüksek olmadığı görülmüştür. Etoposid'i, $Al(OH)_3$ nanopartikülü ile kombine dozladığımızda Etoposid'in etkisinin arttığı görülmüştür. Böylece daha az dozda Etoposid kullanarak tedavi planlanabilir ve Etoposid'in yan etkileri azaltılabilir. Bu çalışmalar genişletilerek daha fazla veri toplanabilir ve sonuçlar daha detaylı incelenebilir.

Yaptığımız deneyler sonucunda ayrıca $Al(OH)_3$ nanopartikülünün hem akciğer kanseri hücrelerinde hem de sağlıklı akciğer hücrelerinde arasında Etoposid etkinliğini arttırıp azaltmakta anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür.

Bu tez çalışmasına ek olarak $Al(OH)_3$ nanopartikülünün özellikleri daha ayrıntılı araştırılabilir. Gen ekspresyonları üzerine etkisi bakılabilir. Protein interaksiyonları araştırılabilir. Ayrıca epigenetik mekanizmalara bakılarak ve daha ayrıntılı çalışmalar yapılarak $Al(OH)_3$ nanopartikülünün Etoposid ile kullanımı sağlanabilir. Böylece hastaların tedavi sürecinde daha az yan etki ile karşılaşıp kendilerini fizyolojik ve psikolojik olarak daha iyi hissetmeleri sağlanabilir.

KAYNAKLAR

Aizawa, K. Tang, C. Liu, S. (2016). Tobacco carcinogen induces both lung cancer and non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinomas in ferrets which can be attenuated by lycopene supplementation. *Int J Cancer*. 139, 1171-1181.

Akhtar, M., Alhadlaq, H., Alshamsan, A. (2015). Aluminum doping tunesbandga penergylevel as well as oxidativestress-mediatedcytotoxicity of ZnO nanoparticles in MCF-7 cells. *SciRep 5*, 13876.

Anonim, (2018). Erişim adresi: http://www.guatrcenter.com/tr/Content2.asp?m1=1&m2=10.

Anonim, (2016). Erişim adresi: https://stringfixer.com/tr/Etoposide

Anonim, (2020). Erişim adresi: https://www.atamanchemicals.com/alüminium hydroxide_u25569/?lang=TR#:~:text=Al%C3%BCminyum%20hidroksit %2C%20 Bayer % 20 prosesi%20ile,m%C3%BCteakip%20art%C4%B1%C5%9Flar%20pepsinin%20etkisini % 20engelleyebilir

Anonim, (2016a). Erişim adresi: https://euon.echa.europa.eu/general-information

Anonim a, (2021). Erişim adresi: https://www.nanokar.com.tr/blog/aluminyum-hidroksit-al-oh-3

Anonim b, (2021). Erişim adresi: https://www.cancer.gov/about-cancer/ understanding /what-is-cancer

Anonim c, (2021). Erişim adresi:https://tr.wikipedia.org/wiki/Lösemi

Anonim d, (2023). (https://www.drozdogan.com/anjiyogenez-yeni-damar-olusumunun-kanser-ve-tedavileri-icin-onemi-nedir/)

Antwi, S.O. Eckert, E.C. , Sabaque, C.V. (2015). Exposure to environmental chemicals and heavy metals, and risk of pancreatic cancer.*Cancer Causes Control*, 26, 1583-1591.

Arslan, D.Ö., G. Korkmaz, D. Gözüaçık, (2011). Otofaji: Bir hücresel stres yanıtı ve ölüm mekanizması. *Sağlık Bilimleri Dergisi Acıbadem Üniversitesi* Cilt: 2 Sayı: 4

Arvizo, R. R., Bhattacharyya, S., Kudgus, R. A., Giri, K., Bhattacharya, R., & Mukherjee, P. (2012). Intrinsic therapeuticap plications of noble metal nanoparticles: past, presentandfuture. *Chemical Society Reviews*. 41(7), 2943–2970.

Atlı-Şekeroğlu Z. (2013). Nanoteknolojiden nanogenotoksikolojiye: Kobalt-krom nanopartiküllerinin genotoksik etkisi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. 70(1): 33-42.

Baiee, F., Al-Wahab, B.A., Almusawi, A.A., Yu, L.L., Fitri, N., Haron, A.W., (2020). Effect of vitrification on spermatozoa quality in bull semen. *EurAsian J Biosci*. 14(2).

Baran, Y. (2018). Kanser Moleküler Biyojisi. Kısayol Yayıncılık.

Baykara, O. (2015). Current Therapies and Latest Developments in Cancer Treatment. *Horizons in Cancer Research*. s.105-156, 57.

Bhattacharyya, S., Kudgus, R. A., Bhattacharya, R., & Mukherjee, P. (2011). Inorganic nanoparticles in cancer therapy. *Pharma ceutical research*. 28(2), 237–259.

Borm, P., Robbins, D., Haubold, S., Kuhlbusch, T., Fissan, H., Donaldson, K., Schins, R., Stone, V., Kreyling, W., Lademann, J., Krutmann, J., Warheit, D., Oberdorster, E. (2006). The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Part Fibre Toxicol*. 2(11): 1–35.

Bustani, G.S., Baiee, F.H. (2021). Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. *Vet World*. 14(5):1220.

Buzea, C., Blandino, I.P., Robbie, K. (2007). Nanomaterials and Nanoparticles: SourcesandToxicity. *Biointerphases*, 2(4): 17 – 71.

Cho D.Y., Lin S.Z., Yang W.K., Lee H.C., Hsu D.M., Lin H.L., Chen C.C. ve ark. (2013). Targeting cancer stem cells for treatment of glioblastoma multiforme. *Cell Transplant*. 22(4), 731-9.

Cigudosa, J.C. Parsa, N.Z. Louie, D.C. (1999). Cytogenetic analysis of 363 consecutively ascertained diffuse large B-cell lymphomas Genes, *Chromosomes Cancer*. 25,123-133.

Cumberbatch, M.G. , Cox, A. , Teare ,D., Catto ,J.W (2015). Contemporary occupational carcinogen exposure and bladder cancer: a systematic review and meta-analysis

Curto, M.,(2007). Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. *The Journal of cell biology* 177(5), 893-903.

Çıracı, S. (2005). Metrenin Milyarda Birinde Bilim ve Teknoloji. *Bilim ve Teknik Yeni Ufuklara*, 8 (s .6-10.)

Dikilitaş, M., Koçyiğit, A. (2010). Canlılarda "Tek Hücre Jel Elektroforez" Yöntemi İle DNA Hasar Analizi (Teknik Not): Comet Analiz Yöntemi. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 14(2): 77- 89.

Ellis, L.M. ve Hicklin, D.J. (2008). VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nature reviews cancer*. 8(8),579-591.

Eruslanov, E. & Kusmartsev, S. (2010). Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 594. 57-72. Doi 10.1007/978-1-60761-411-1_4.

Eslaminejad, T. ve ark. (2022). Brain Cancer Treatment; A Systematic Review. *International Journal of Cancer Management*. 15.

Fisher, R., Pusztai, L. Swanton, C. (2013). Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics.*Br J Cancer*. 108, 479-485.

Franken, N.A., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., Van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 339.

Garfinkel L, Stellman S.D. (1988). Smoking and lung cancer in women: findings in a prospective study. *Cancer Res*. 48, 6951-5.

Geddes D.M. (1979). The natural history of lung cancer: a review based on rates of tumour growth. *Br J Dis Chest*. 73: 1-17.

Ginsberg R.J., Vokes E.E., Rosenzweig K. (2001). Non-small cell lung cancer. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. Cancer principles and practice of oncology. 6th ed. Philadelphia: LippincottWilliams & Wilkins. 925-83.

Gordaliza, M., García, P.A., Corral, J.M., Castro, M.A., Gómez-Zurita, M.A. (2004). Podofillotoksin: dağıtım, kaynaklar, uygulamalar ve yeni sitotoksik türevler. *Zehir.* 44 (4):441–59.

Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T ve ark. (2001). Cancer statistics.*CA Cancer J Clin*. 51, 15-36.

Hanahan, D., Weinberg, R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 144, 646-674.

Hande, K.R. (1998). Etoposit: bir topoizomeraz II inhibitörünün kırk yıllık gelişimi. *Avro. J. Kanser. 34 (10):* 1514–21.

Hendriks L.E., Hermans B.C., Everdingen M.H., Hochstenbag M.M., Dingemans A.M.. (2016). Effect of Bisphosphonates, Denosumab and Radioisotopes on Bone Pain and Quality of Life in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer and Bone Metastases: A Systematic Review. *J Thorac Oncol*. 11(2):155-73.

JAMA.,*Oncology*, 1,1282-1290.

Jung Y.W., Hysolli E., Kim K.Y., Tanaka Y., Park I.H. (2012). Human induced pluripotent stem cells and neurodegenerative disease: prospects for novel therapies. *Curr Opin Neurol*. 25(2)b, 125-30.

Karlsson, H.L., Cronholm, P., Gustafsson, J., Möller, L. (2008). Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem Res Toxicol*. 21(9), 1726-1732.

Kawai, T. ve ark., (2007). Telomere length and telomerase expression in atypical adenomatous hyperplasia and small bronchioloalveolar carcinoma of the lung. *American journal of clinical pathology*. 127(2), 254-262.

Khashan, K.S., Sulaiman, G.M., Hussain, S.A. (2020). Synthesis, Characterizationand Evaluation of Anti-bacterial, Anti-parasiticand Anti-cancer Activities of Aluminum-Doped Zinc Oxide Nanoparticles. *J Inorg Organomet Polym.* 30, 3677–3693.

Kim, Y.J., Choi, H.S., Song, M.K., Youk, D.Y., Kim, J.H., Ryu, J.C. (2009). Genotoxicity of Aluminum Oxide (Al2O3) Nanoparticle in Mammalian Cell Lines. Mol. Cell. Toxicol., 5(2), 172-178.

Kjuus H., Skjaerven R., Langard S. (1986). A casereferent study of lung cancer, occupational exposure, and smoking II: role of asbestos exposure. *Scand J Work Environ Health*. 12, 203-9.

Kumbıçak, Ü. (2013) Bakır-Çinko Alaşım Nanopartiküllerinin İnvitro Sitotoksik ve Genetoksik Etkilerinin Araştırılması. *Doktora Tezi*, Bursa Uludağ Üni., Fen Bilimleri Enstitüsü.

Lerner M. I., Georgy M., Alexey A. T., Aleksandr S. L., Elazar G., Irena G., Andreja B., Vito T., Boris T., Sergey G. P., Vasiljeva, O. (2018). Crumpled Aluminum Hydroxide Nanostructures as a Microenvironment Dysregulation Agent for Cancer Treatment. *Nano Letters.* 18 (9), 5401-5410.

Lin, W., Stayton, I.,Huang,Y., Zhou, X.,Ma Y. (2008). Cytotoxicity and cell membrane depolarization induced by aluminum oxide nanoparticles in human lung epithelial cells A549. *Toxicological & Environmental Chemistry.*983, 9-90.

Love, S.A., Maurer-Jones, M.A., Thompson, J.W., Lin, Y-S., Haynes, C.L. (2012). Assessing nanoparticle toxicity. *Annu Rev Anal Chem.* 5, 181-205.

Manisha, P. (2012). Leukemia: a review article. *International Journal of Advanced Research in Pharmaceutical & Bio Sciences*, 1(4), 397.

Matlashewski, G. Lamb, P.,Pim, D.,Peacock, J., Crawford, L., Benchimol,S. (1984). Iso lation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene.

McPartlin A., Grimaldo C., Lyons J., Burke D., Mitra S., Choudhury A. (2014). Successful delivery of chemotherapy to treat small-cell prostate cancer in a patient undergoing haemodialysis. *Clin Kidney J*. 7(6), 593-4.

Meacham, C.E., Morrison, S.J. (2013). Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*. 501, 328-337.

Mian M., Tinelli M., March E., Turri G., Meneghini V., Pescosta N., Berno T. ve ark. (2016). Bortezomib, Thalidomide and Lenalidomide: Have They Really Changed the Outcome of Multiple Myeloma? *Anticancer Resport.* 36(3),1059-65.

Morb Mortal Wkly Report (MMWR). (1997). Cigarette smoking among adults. 46-1217,20.

Olsen I.H., Knigge U., Federspiel B., Hansen C.P., Skov A., Kjær A., Alnger S.W. (2014). Topotecan monotherapy in heavily pretreated patients with progressive advanced stage neuroendocrine carcinomas. *J Cancer.* 5(8), 628-632.

Omenn G.S. Merchant J. Boatmann E. Ve ark. (1986). Contribution of environmental fibres to respiratory cancer. *Environ Health Perspect*. 70, 51-6.

Pacmayr, E., Treese, C., Stein, U. (2017). Underlying Mechanisms for Distant Metastasis. *Molecular Biology*. 33, 11-20.

Papageorgiou, I, Brown, C., Schins, R, Singh, S, Newson, R, Davis, S. ve arkadaşları. (2007) The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt-chromium alloy on human fibroblasts in vitro. *Biomaterials*. 28, 2946–58.

Parkin, D.M. (2006).The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*. 118, 3030-3044.

Parry, M.C., Bhabra, G., Sood, A., Machado, F., Cartwright, L., Saunders, M., ve arkadaşları. (2010). Thresholds for indirect DNA damage across cellular barriers for orthopaedic biomaterials. *Biomaterials*. 31 (16), 4477-83.

Partanen, J.I., A.I. Nieminen, and J. Klefstrom, (2009). 3D view to tumor suppression: Lkb1, polarity and the arrest of oncogenic c-Myc. *Cell Cycle*. 8(5), 716-724.

Patil Y., Amitay Y., Ohana P., Shmeeda H., Gabizon A. (2016). Targeting of pegylated liposomal mitomycin-C prodrug to the folate receptor of cancer cells: Intracellular activation and enhanced cytotoxicity. *J Control Release*. 225, 87-95.

Patil, U.S., Adireddy, S., Jaiswal, A., Mandava, S., Lee, B.R., Chrisey, D.B. (2015) In vitro/in vivo toxicity evaluation and quantification of iron oxide nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 16(10), 24417-50.

Pavese, J.M., Farmer, R.L. ve Bergan, R.C. (2010). Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29, 465-482.

Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H., Marchand, C. (2010). DNA topoizomerazları ve bunların antikanserleri ve mikroorganizmalarıla virüsleri. *Kimya Biol.* 17 (5), 421–33.

Poon, S.L., McPherson, J.R., Tan, P., Teh, B.T., Rozen S.G. (2014).Mutation signatures of carcinogen exposure: genome-wide detection and new opportunities for cancer prevention. *Genome Med*. 6 , 24.

Roduner, E. (2006). Size matters: why nanomaterials are different. *Chem. Soc. Rev*., 35, 583-592.

Schirrmacher, V. (2019). From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *Int J Oncol*. 54(2):407-419.

Schottenfeld, D. Fraumeni, J.F. Jr. (2006). Cancer Epidemiology and Prevention. *Oxford University Press*.

Schrand, A. M., Rahman M. F., Hussain, S. M., Schlager, J., Smith, D. A., Syed, A. F. (2010).Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2 (5), 544–568.

Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D., and Boyd, M.R. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Resport.*. 48, 4827–4833.

Seto, M., Honma K., Nakagawa, M. (2010). Diversity of genome profiles in malignant lymphoma. *Cancer Science*. 101, 573-578.

Shtivelman E. , Lifshitz, B. Gale, R.P. Canaani E. (1985).Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia.*Nature*, 315, 550-554.

Siegel, R.L. , Miller, Jemal, K.D. A. (2016). Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 66 (2016). 7-30.

Sun, Z., Wang, W., Wang, R. (2010). Aluminum nanoparticles enhance anticancer immune response induced by tumor cell vaccine. *Cancer Nanotechol*. 1, 63–69.

Takahashi K., Yamanaka S. (2013). Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. *Development*. 140(12), 2457-61.

Takeuchi, A., Eto, M., Tatsugami, K., Yamada, H., Yokomizo, A., Shiota, M., Itsumi, M. ve ark. (2015). Renal cancer treatment with recipient lymphocyte infusion enhanced the antitumor effect of nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Transpl Immunol.* 32(2), 131-9.

Tebbi, C.K. (2021). Etiology of Acute Leukemia: A Review. *Cancers*. 13, 2256.

Thomas, B. A. ve Mullighan C. G. (2021). Molecular Biology of Childhood Leukemia *Annual Review of Cancer Biology.* 5(1), 95-117.

Trafialek, J. Kolanowski, W. (2014). Dietary exposure to meat-related carcinogenic substances: is there a way to estimate the risk?*Int J Food Sci Nutr*. 65, 774-780.

Tsaousi, A., Jones, E., Case, C.P. (2010). The in vitro genotoxicity of orthopaedic ceramic (Al_2O_3) and metal (CoCr alloy) particles. *Mutat Resport*. 697 (2), 1-9.

Uzun, J.L. (2002). Kanser ve Tedavileri İçin Bir Kılavuz. *Gale Kanser Ansiklopedisi*. 397–399.

Wald NJ, Nanchahal K, Thompson S.G. ve ark. (1986). Does breathing other people's smoke cause lung cancer? *BMJ*. 293 (s.1217-22.)

Weinberg, R. A. (2014). The Biology of Cancer. (2nd ed). Garland Science.

WHO, (2008). The Global Burden of Disease: 2004 update. WHO, Switzerland. 12.

Wittekind, C. ve Neid, M. (2005). Cancer invasion and metastasis. *Oncology*. 69, 14-16.

Yah, C. S. (2013). The toxicity of Gold Nanoparticles in relation to their physiochemical properties. *Biomed Resport*. 24 (3), 400-413.

Yang I.A., Shaw J.G., Goddard J.R., Clarke M., Reid D.W. (2016). Use of inhaled corticosteroids in COPD: improving efficacy. *Expert Rev Respir Med*. 10(3), 339-50.

Yang P., Wentzlaff K.A., Katzmann J.A. ve ark. (1998). Alpha1 antitrypsin deficiency allele carriers among lung cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 8, 461.

Yoo, K.Y, Shin,H.R. (2003). Cancer epidemiology and prevention. *Korean J Epidemiol*. 25, 1-15.